

Elektronen- und Protonentransport
der Cytochrom-c-Oxidase
aus *Paracoccus denitrificans*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Maarten Ruitenber
aus Berlin

Frankfurt am Main
2001
(DF1)

vom Fachbereich 14 (Chemische und pharmazeutische Wissenschaften) der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst Bamberg

2. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Michel

Datum der Disputation: 10.09.2001

Meiner Frau Ramona in Liebe gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungen.....	vii
1. Einleitung.....	i
1.1. Struktur und Funktion der Cytochrom-<i>c</i>-Oxidase	1
1.2. Katalytischer Zyklus und Protonenpumpmechanismen.....	5
1.2.1. Das klassische Modell	6
1.2.2. Das Modell nach Michel (1998).....	8
1.2.3. Das Modell nach Wikström (2000)	10
1.3. Motivation und Ziele dieser Arbeit.....	12
2. Materialien und Methoden	14
2.1. Herstellung von Proteoliposomen	14
2.1.1. Beladen der Liposomen mit Rubpy bzw. Zn^{2+}	14
2.2. BLM-Messungen.....	15
2.2.1. Versuchsaufbau	15
2.2.2. Durchführung.....	17
2.2.3. Elektrische Eigenschaften der Verbund-Membran.....	19
2.2.4. Datenanalyse.....	21
2.3. Spektroskopische Messungen	22
2.4. Herstellung von <i>caged</i>-Sauerstoff.....	23
2.4.1. Synthese von (μ -superoxo)bis[pentaammincobalt(III)], saures Sulfat.....	23
2.4.2. Synthese von (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)]	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Der O \rightarrow E Übergang	24
3.1.1. Einstellen des vollständig oxidierten Zustandes O.....	24
3.1.2. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen	25
3.1.3. Abhängigkeit der Signalgröße von der Rubpy-Konzentration	28
3.1.4. Überprüfung der Membranpermeabilität für Rubpy	29
3.1.5. Einfluß von D_2O auf die Kinetik des O \rightarrow E Übergangs	29

3.1.6. Einfluß von Punktmutationen auf Vorgänge während des O → E Übergangs	31
3.1.6.1. D-Weg-Mutanten.....	31
3.1.6.2. K-Weg-Mutanten.....	33
3.1.7. Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen.....	34
3.2. Der O → R Übergang; Mehrfach-Blitz Experimente	36
3.2.1. Einfluß von D ₂ O auf die Kinetik des O → R Übergangs	39
3.2.2. Einfluß von Punktmutationen auf Vorgänge während des O → R Übergangs	40
3.3. Der E → R Übergang	42
3.3.1. Der MV-CO Zustand	42
3.3.1.1. Einstellen des MV-CO Zustandes	42
3.3.1.2. Spannungsmessungen am MV-CO Enzym	44
3.3.2. Der einelektronenreduzierte Zustand E	45
3.3.2.1. Einstellen des E-Zustandes	46
3.3.3. Einelektronenreduktion des E-Zustandes	49
3.3.3.1. Spannungsmessungen am WT-Enzym	49
3.3.3.2. Spannungsmessungen an der D124N-Mutante.....	51
3.3.3.3. Spannungsmessungen an der K354M-Mutante	52
3.4. Der R → P Übergang; Verwendung von caged-O₂.....	54
3.4.1. Eigenschaften von (μ-superoxo)bis[pentaammincobalt(III)] und (μ-peroxo)(μ-hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)]	54
3.4.2. Spannungsmessungen am MV-CO Enzym in Gegenwart des Peroxo-Komplexes	57
3.5. Der P → F Übergang	59
3.5.1. Einstellen des Peroxy-Zustandes P.....	59
3.5.2. Spannungsmessungen am P-Zustand in Gegenwart von Rubpy	60
3.6. Der F → O Übergang	62
3.6.1. Einstellen des Ferryl-Zustandes F	62
3.6.2. Spannungsmessungen am F-Zustand in Gegenwart von Rubpy	63
3.7. Einfluß von Zn²⁺ auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus.....	65
3.7.1. Zn ²⁺ innerhalb der Liposomen.....	65
3.7.2. Zn ²⁺ außerhalb der Liposomen	67

4. Diskussion	69
4.1. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen	69
4.2. Der O → E Übergang	71
4.2.1. Zuordnung der einzelnen Phasen im Spannungssignal	71
4.2.2. Die Rolle der Protoneneintrittspfade K und D	72
4.2.3. Welcher Prozeß bewirkt die Aufnahme des Protons?	73
4.2.4. Die relative Position von Häm <i>a</i> im Dielektrikum (<i>rdla</i>)	76
4.2.5. Zusammenfassung	78
4.3. Der E → R Übergang	79
4.3.1. Das MV-CO Enzym	79
4.3.2. Der einelektronenreduzierte Zustand E	81
4.3.3. Einelektronenreduktion des E-Zustandes	82
4.4. Der R → P Übergang; Verwendung von <i>caged</i>-Sauerstoff.....	85
4.5. Der P → F Übergang	87
4.6. Der F → O Übergang	88
4.6.1. Zuordnung der einzelnen Phasen im Spannungssignal	88
4.6.2. Die Rolle der Protoneneintrittspfade K und D	90
4.6.3. Zusammenfassung	90
4.7. Neues Modell für den katalytischen Zyklus in <i>P. denitrificans</i> COX	91
4.8. Einfluß von Zn²⁺ auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus.....	97
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis	101
7. Danksagung	112
8. Lebenslauf.....	113

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung.....	i
Abb. 1.1. Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette.	2
Abb. 1.2. Darstellung der 2 Kernuntereinheiten I und II aus <i>P. denitrificans</i> COX.	3
Abb. 1.3. Vereinfachte Darstellung des katalytischen Zyklus in COX ohne Berücksichtigung von Protonenaufnahme und -pumpschritten.	5
Abb. 1.4. Mechanismus der Sauerstoffreduktion am binuklearen Zentrum von COX nach (Wikström, 1989).	7
Abb. 1.5. Mechanistisches Modell für den katalytischen Zyklus von COX nach (Michel, 1998).	9
Abb. 1.6. Mechanistisches Modell für den katalytischen Zyklus von COX nach (Wikström, 2000).	11
Abb. 1.7. Vereinfachte schematische Darstellungen kürzlich vorgeschlagener Modelle für den katalytischen Zyklus in COX.	13
2. Materialien und Methoden	14
Abb. 2.1. Meßaufbau für photoelektrische Messungen an schwarzen Membranen unter anaeroben Bedingungen.	15
Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Meßküvette.	16
Abb. 2.3. Struktur und Absorptions- bzw. Emissionsspektrum von Rubpy.	18
Abb. 2.4. Reaktionsschema von Rubpy nach (Geren et al., 1991).	18
Abb. 2.5. Ersatzschaltbild der BLM mit angelagerten Proteoliposomen.	19
Abb. 2.6. Schematische Darstellung des Blitzlicht-Photolyse-Aufbaus.	22
3. Ergebnisse	24
Abb. 3.1. UV/Vis-Spektren von oxidiertem und reduziertem COX.	25
Abb. 3.2. Verschiedene Artefakte bei Spannungsmessungen.	25
Abb. 3.3. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen an COX-Liposomen.	26
Abb. 3.4. Abhängigkeit der Signalgröße von der Rubpy-Konzentration bei Strom- und Spannungsmessungen.	28
Abb. 3.5. Lichtinduzierte Spannungsänderungen, gemessen an Proteoliposomen mit eingeschlossenem Rubpy.	29
Abb. 3.6. Vergleich von Spannungsmessungen in H ₂ O und D ₂ O.	30

Abb. 3.7. Einfluß der D124N- bzw. E278Q-Mutation auf Vorgänge während des O → E Übergangs.	32
Abb. 3.8. Einfluß der K354M- und D124N/K354M-Mutationen auf Vorgänge während des O → E Übergangs.	33
Abb. 3.9. Absorptionsänderungen bei 605 nm während des O → E Übergangs.....	34
Abb. 3.10. Mehrfach-Blitz Experimente am WT-Enzym unter anaeroben Bedingungen.....	37
Abb. 3.11. Potentialänderung Dithionit-reduzierter COV nach Lichtanregung in Gegenwart von Rubpy.	38
Abb. 3.12. Auswirkung von Punktmutationen auf Spannungsänderungen während des O → R Übergangs.	40
Abb. 3.13. Spektrale Änderungen bei der Reaktion oxidierter COV mit CO unter anaeroben Bedingungen.	43
Abb. 3.14. Vergleich von Spannungsmessungen in H ₂ O und D ₂ O.	44
Abb. 3.15. Spektrale Änderungen bei der Reaktion von Oxoferryl-COV (WT) mit CO unter anaeroben Bedingungen.....	47
Abb. 3.16. Einfluß von Punktmutationen (D124N, K354M) auf die Bildung des E-Zustandes.....	48
Abb. 3.17. Mehrfach-Blitz Experimente am WT-Enzym unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.....	49
Abb. 3.18. Mehrfach-Blitz Experimente an der D124N-Mutante unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.....	51
Abb. 3.19. Mehrfach-Blitz Experimente an der K354M-Mutante unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.....	52
Abb. 3.20. Stabilität von <i>caged</i> -O ₂ in Gegenwart von Glucose-Oxidase.....	55
Abb. 3.21. Absorptionsänderungen nach Belichtung des Peroxo-Komplexes.	56
Abb. 3.22. Abhängigkeit der Photospannung von der <i>caged</i> -Sauerstoff-Konzentration.	57
Abb. 3.23. Differenzspektrum P minus O.	60
Abb. 3.24. Ausbildung eines Membranpotentials nach Einelektronenreduktion des P-Zustandes.....	61
Abb. 3.25. Differenzspektrum F minus O.	62
Abb. 3.26. Elektrogene Schritte beim F → O Übergang in WT, K354M und D124N.	63
Abb. 3.27. Einfluß von internem Zn ²⁺ auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus von COX.	66

Abb. 3.28. Einfluß von externem Zn^{2+} auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus von COX.	67
Tab. 3.1. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang in H_2O und D_2O	31
Tab. 3.2. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang bei D-Weg-Mutanten.	32
Tab. 3.3. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang bei K-Weg-Mutanten.	34
Tab. 3.4. Zeitkonstanten für den $\text{O} \rightarrow \text{R}$ Übergang in H_2O und D_2O	39
Tab. 3.5. Zeitkonstanten für den $\text{O} \rightarrow \text{R}$ Übergang bei K- und D-Weg-Mutanten.	41
Tab. 3.6. Zeitkonstanten und relative Amplituden für die Elektronenrückfluß-Reaktion in H_2O und D_2O	45
Tab. 3.7. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{E} \rightarrow \text{R}$ Übergang bei WT, D124N und K354M.	53
Tab. 3.8. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{P} \rightarrow \text{F}$ Übergang.	61
Tab. 3.9. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang bei WT, K354M und D124N.	64
Tab. 3.10. Einfluß von internem Zn^{2+} auf die Zeitkonstanten verschiedener Teilschritte im katalytischen Zyklus von COX.	66
4. Diskussion	69
Abb. 4.1. Mögliche Mechanismen der Einelektronenreduktion vollständig oxidiertter COX.	74
Abb. 4.2. Schematische Darstellung der für den $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang erhaltenen Ergebnisse.	78
Abb. 4.3. Schematische Darstellung der für den $\text{E} \rightarrow \text{R}$ Übergang erhaltenen Ergebnisse.	85
Abb. 4.4. Schematische Darstellung der für den $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang erhaltenen Ergebnisse.	90
Abb. 4.5. Mögliche Mechanismen der Sauerstoffreduktion in <i>P. denitrificans</i>	93

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
a.u.	<i>arbitrary units</i> = willkürliche Einheiten
BLM	<i>black lipid membrane</i> = optisch schwarze Lipiddoppelschicht
bpy	2,2'-bipyridyl
COX	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase
COV	mit Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase rekonstituierte Vesikel
Cyt	Cytochrom
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENDOR	<i>electron nuclear double resonance</i>
EXAFS	<i>extended x-ray-absorption fine structure analysis</i>
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Konst.	Konstante
Konz.	Konzentration
LM	Dodecyl- β -D-maltosid, „Laurylmaltosid“
MV-CO	mit CO vergiftetes <i>mixed-valence</i> Enzym
n.b.	nicht bestimmt
<i>P. denitrificans</i>	<i>Paracoccus denitrificans</i>
P _i	anorganisches Phosphat
PMK	protonenmotorische Kraft
<i>Rb. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
rdla	rel. dielektrischer Abstand von Häm <i>a</i> zur extrazellulären Oberfläche
rel. Amp.	relative Amplitude
Rubpy	Ru ^{II} (2,2'-bipyridyl) ₃ Cl ₂
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
w/v	<i>weight per volume</i> = Gewichtsprozent

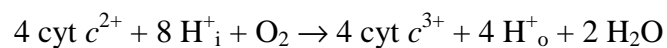
1. Einleitung

Über die Cytochrom-*c*-Oxidase (COX) sind eine Reihe sehr guter Übersichtsartikel verfügbar (Ferguson-Miller und Babcock, 1996; Michel et al., 1998; Kannt und Michel, 2000; Zaslavsky und Gennis, 2000). Daher soll in dieser Einleitung nur kurz auf Struktur und Funktion des Enzyms eingegangen werden. Der Schwerpunkt liegt vielmehr auf den in letzter Zeit veröffentlichten unterschiedlichen mechanistischen Modellen.

1.1. Struktur und Funktion der Cytochrom-*c*-Oxidase

COX ist das terminale Enzym in den Atmungsketten von Mitochondrien und vielen aeroben Bakterien (Abb. 1.1.). Sie katalysiert den Elektronentransfer von Cytochrom *c* (Cyt *c*) auf molekularen Sauerstoff, wobei letzterer zu Wasser reduziert wird. Die für die Wasserbildung benötigten Elektronen werden hierbei über das Cyt *c* von der periplasmatischen Seite bzw. dem Intermembranraum geliefert, die Protonen stammen aus dem Cytoplasma bzw. der Matrix. Weiterhin werden pro Sauerstoffmolekül 4 Protonen durch das Enzym gepumpt (Wikström, 1977). Die resultierende protonenmotorische Kraft kann dann von einer F₀F₁-ATP-Synthase genutzt werden, um ATP zu synthetisieren.

Die von der COX katalysierte Reaktion läßt sich durch folgende Nettogleichung beschreiben



mit H^+_{i} = aus dem Cytoplasma bzw. der Matrix aufgenommene Protonen und H^+_{o} = ins Periplasma bzw. in den Intermembranraum abgegebene Protonen.

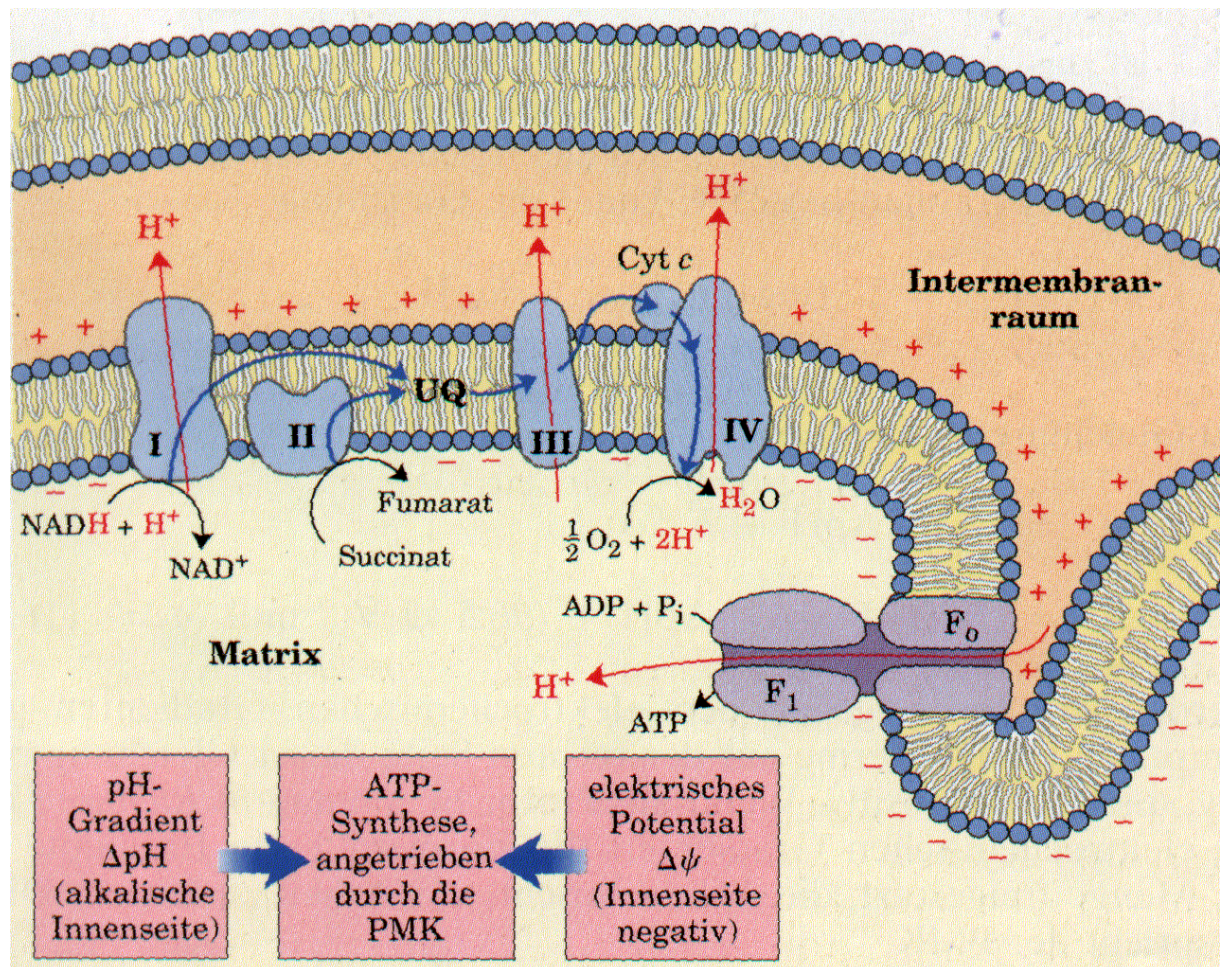


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette (Lehninger et al., 1994).

Stoffwechselzwischenprodukte wie NADH und Succinat übertragen Elektronen über die Komplexe I-IV und die mobilen Elektronencarrier Ubichinon und Cyt *c* auf die COX. Der Elektronenfluß ist von einem Protonentransfer über die Membran begleitet, wobei sowohl ein chemischer (ΔpH) als auch ein elektrischer ($\Delta\psi$) Gradient erzeugt wird. Die resultierende protonenmotorische Kraft (PMK) treibt eine F_0F_1 -ATP-Synthase schließlich zur Synthese von ATP aus ADP und P_i an.

Die Röntgenstruktur der Rinderherz-Mitochondrien-Oxidase (Tsukihara et al., 1995; 1996; Yoshikawa et al., 1998a; 1998b) und die der COX aus dem Bodenbakterium *P. denitrificans* (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1997) sind bekannt.

COX aus *P. denitrificans* besteht aus 3 Kernuntereinheiten (I, II und III) und einer kleinen, nicht konservierten Untereinheit IV unbekannter Funktion (Witt und Ludwig, 1997). Abb. 1.2. zeigt die Struktur der funktionell aktiven 2-Untereinheiten COX.

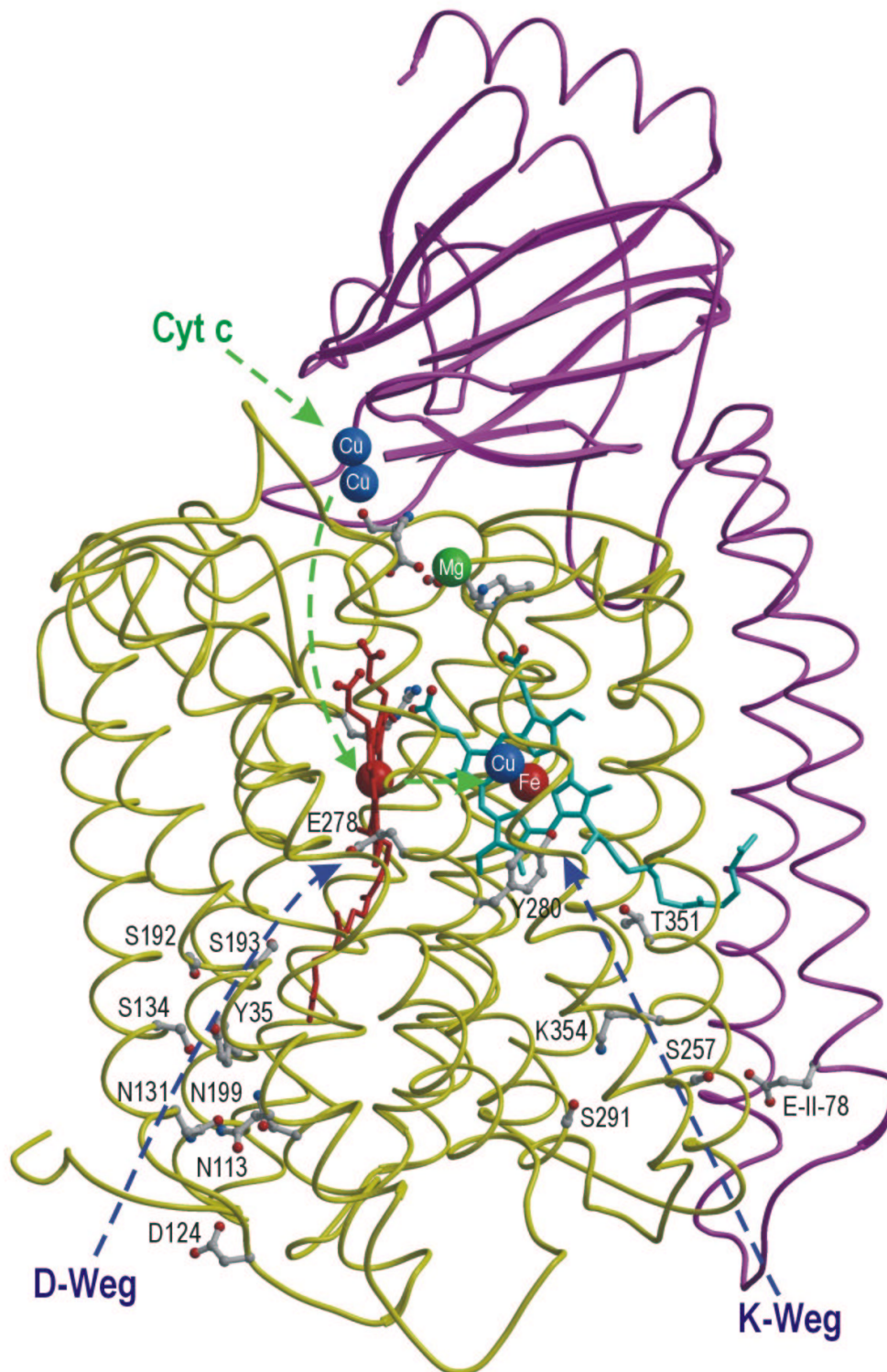


Abb. 1.2. Darstellung der 2 Kernuntereinheiten I und II aus *P. denitrificans* COX.

Elektronen werden von Cyt *c* auf das binukleare Cu_A -Zentrum übertragen und gelangen über Häm *a* (rot, linkes Porphyrin) zum katalytischen Zentrum, bestehend aus Häm *a*₃ (türkis, rechtes Porphyrin) und Cu_B . Protonen können über 2 Wege zum Ort der Katalyse transportiert werden: der D-Weg startet bei Asp-124 und führt über eine Reihe polarer Reste zum Glu-278, der K-Weg verläuft über Ser-291, Lys-354, Thr-351 und Tyr-280.

COX besitzt 4 redox-aktive Metallzentren. Elektronen gelangen von Cyt *c* über das binukleare Cu_A-Zentrum zum *low-spin* Häm *a* und werden von dort zum aktiven Zentrum, bestehend aus *high-spin* Häm *a*₃ und Cu_B transportiert. *High-spin* bedeutet hierbei, daß das Zentralion Eisen aufgrund der Hundschen Regel die größtmögliche Zahl ungepaarter d-Elektronen besitzt und mit einer Reihe verschiedener Liganden reagiert, beim *low-spin*-Zustand liegt die geringstmögliche Zahl ungepaarter d-Elektronen vor und es findet keine Reaktion mit Liganden wie O₂, CO, HCN, HN₃, H₂S usw. statt.

Basierend auf der Kristallstruktur wurden 3 mögliche Protonentransferwege (K-, D- und H-Weg) vorgeschlagen (Gennis, 1998; Yoshikawa et al., 1998b), wobei letzterer zumindest in Prokaryonten funktionell keine Rolle zu spielen scheint (Gennis, 1998; Pfitzner et al., 1998). Die Bedeutung der anderen beiden Wege ist durch intensive funktionelle Untersuchungen an Mutanten eindeutig nachgewiesen.

Der K-Weg, benannt nach dem hochkonservierten Lys-354 (im folgenden wird immer *P. denitrificans* Numerierung verwendet), führt über Lys-354 und Thr-351 zur Hydroxyl-Gruppe von Tyr-280 am katalytischen Zentrum.

Der D-Weg ist nach dem konservierten Asp-124 am Eingang benannt und führt von dieser Aminosäure über eine Reihe konservierter Reste (Asn-199, Asn-113, Asn-131, Tyr-35, Ser-134, Ser-193) zu Glu-278. Von dort ist der weitere Weg der Protonen nicht genau bekannt. Eine Möglichkeit bestünde darin, daß die Seitenkette von Glu-278 zwischen verschiedenen Positionen hin und her wechseln kann und somit als Schalter dient. In der einen Position könnte dieser Rest dann Substrat-Protonen zum aktiven Zentrum transportieren (Pomès et al., 1998), in einer anderen Orientierung eine transiente Verbindung mit den Häm-Propionaten herstellen, um so direkt Protonen über die Membran zu pumpen (Hofacker und Schulten, 1998).

Durch elektrostatische Berechnungen (Kannt et al., 1998a) basierend auf der Kristallstruktur von *P. denitrificans* konnte ein Cluster von ionisierbaren Gruppen identifiziert werden, das mit den redox-aktiven Kofaktoren stark wechselwirkt. Dieses Cluster, das eine Reihe konservierter Reste in der Nachbarschaft der Häm-Propionate und der Magnesium-Bindestelle umfaßt, könnte als Akzeptor von Protonen dienen, die durch einen der beiden Protonen-Wege aufgenommen wurden, und in bestimmten Teilschritten des Protonenpumpmechanismus eine wichtige Rolle spielen (Puustinen und Wikström, 1999; Behr et al., 2000).

1.2. Katalytischer Zyklus und Protonenpumpmechanismen

Abb. 1.3. zeigt schematisch die Hauptzwischenprodukte bei der katalytischen Sauerstoffreduktion durch COX.

Ausgehend vom vollständig oxidierten Zustand **O** (=oxidized) wird nach Aufnahme des 1. Elektrons der einelektronen-reduzierte **E**-Zustand (=electronated) erreicht (Moody et al., 1991).

Zufuhr des 2. Elektrons führt zur zweielektronen-reduzierten Spezies **R** (=reduced). Sauerstoff kann nun an das reduzierte Häm a_3 binden und das Zwischenprodukt **A** bilden (Chance et al., 1975).

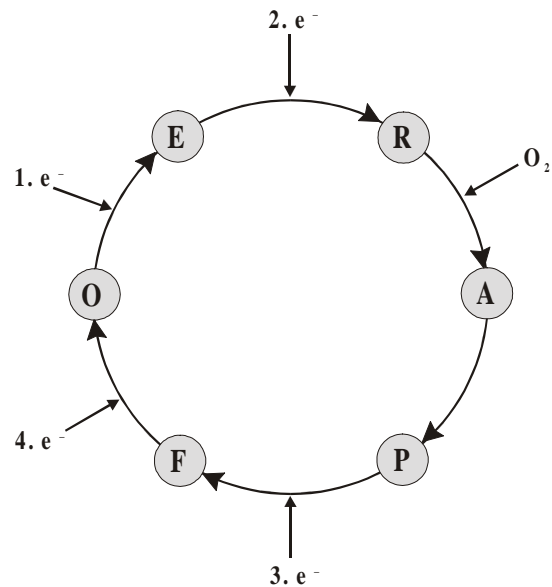


Abb. 1.3. Vereinfachte Darstellung des katalytischen Zyklus in COX ohne Berücksichtigung von Protonenaufnahme und -pumpschritten.

Eine elektronische Umordnung innerhalb des binuklearen Zentrums führt zur Bildung des P_M -Zustandes (=peroxy; in Abb. 1.3. nur mit P bezeichnet) (Morgan et al., 1996; Sucheta et al., 1997), dessen Name von der ursprünglichen Annahme herrührt, daß das Enzym in dieser Form ein Peroxid ($Fe^{III}-O-O-Cu^{II}$) oder Hydroperoxid ($Fe^{III}-OOH-Cu^{II}$) am aktiven Zentrum gebunden hat (Wikström, 1987). In letzter Zeit verdichten sich aber die Hinweise, daß die O-O Bindung in dieser Spezies bereits gespalten ist (Proshlyakov et al., 1996; 1998; Fabian et al., 1999) und eine Oxoferryl-Struktur ($Fe^{IV}=O^2- HO-Cu^{II}$) vorliegt. Die Frage hierbei allerdings ist, wo das für die Sauerstoffspaltung zusätzlich benötigte Elektron herkommt. Denkbar wäre die Oxidation eines benachbarten Aminosäurerestes. Tatsächlich konnte in *P. denitrificans* COX nach H_2O_2 -Behandlung ein Tyrosin-Radikal nachgewiesen werden (MacMillan et al., 1999). Im Absorptionsspektrum besitzt der P-Zustand eine charakteristische Bande bei 607 nm (P minus O).

Zufuhr des 3. Elektrons liefert den **F**-Zustand (=oxoferryl). Diese Spezies hat eine charakteristische Absorptionsbande bei 580 nm (F minus O). Ausgehend vom zweielektronenreduzierten P_M -Zustand kann bei niedrigem pH-Wert ohne Elektronenzufuhr eine Spezies erhalten werden, die ebenfalls eine Bande bei 580 nm aufweist ($F\bullet$) (Moody und Rich, 1994). Umgekehrt existiert auch vom dreielektronenreduzierten F-Zustand eine elektronisch äquivalente Spezies mit Bande bei 607 nm (P_R).

Aufnahme des 4. Elektrons schließlich führt über das Zwischenprodukt **H** (=hydroxy; in Abb. 1.3. nicht dargestellt) (Han et al., 1990) wieder zum vollständig oxidierten Zustand **O**, und der Zyklus kann von Neuem beginnen.

1.2.1. Das klassische Modell

1989 konnte gezeigt werden (Wikström, 1989), daß bei Anwesenheit einer PMK über der Mitochondrienmembran die Oxidase-Reaktion teilweise umgedreht werden kann. Generiert man die PMK durch ATP-Hydrolyse, indem man eine F_0F_1 -ATPase und einen ATP/ADP-Austauscher kombiniert, so kann in Gegenwart von Cytochrom *c* und Ferri-/Ferrocyanid die Oxidase vom O-Zustand zurück in den F- und weiter in den P-Zustand überführt werden (Wikström, 1981; 1987; 1988). Auf diese Weise konnte Wikström klar zeigen, daß sowohl der $P \rightarrow F$ als auch der $F \rightarrow O$ Übergang am Aufbau der PMK beteiligt sind.

Weiterhin schloß Wikström aus den Experimenten, daß bei diesen Übergängen jeweils 2 Protonen gepumpt, 1 Elektron zum katalytischen Zentrum transportiert und 2 Substratprotonen aufgenommen werden (siehe Abb. 1.4.).

Dieser Interpretation liegen aber folgende Annahmen zugrunde:

- a) Die Intermediate des katalytischen Zyklus von COX stehen im thermodynamischen Gleichgewicht.
- b) Die Mitochondrienmembran ist für Protonen impermeabel und die PMK kann aus den ADP und ATP-Konzentrationen berechnet werden.
- c) Die pH-Werte auf beiden Seiten der Mitochondrienmembran sind gleich.
- d) Das katalytische Zentrum liegt in der Mitte des Dielektrikums.

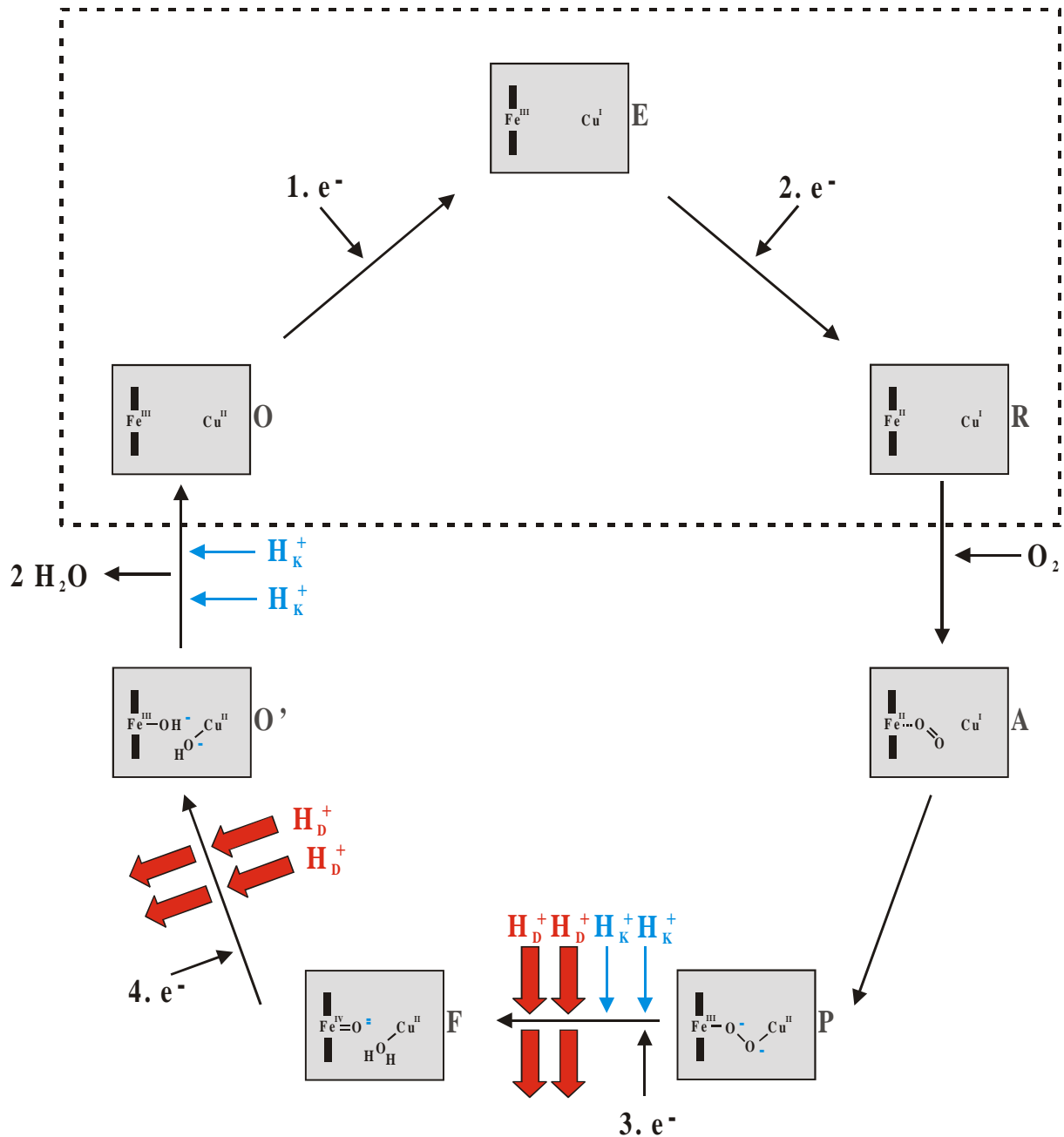


Abb. 1.4. Mechanismus der Sauerstoffreduktion am binuklearen Zentrum von COX nach (Wikström, 1989).

Fe und Cu bezeichnen Häm a_3 bzw. Cu_B . Rechts neben den Boxen ist jeweils die Bezeichnung des Zustandes angegeben. Dem P-Intermediat wurde zu diesem Zeitpunkt noch eine Peroxo-Form zugeschrieben, daher der Name dieser Spezies. O und O' lassen sich durch optische Spektroskopie nicht unterscheiden, die pH-Abhängigkeit des O→F Übergangs deutet aber auf ein Intermediat O' hin. Substratprotonen sind durch dünne blaue Pfeile symbolisiert, gepumpte Protonen durch dicke rote. Der Vorschlag, daß die „chemischen“ Protonen über den K-Weg und die translozierten Protonen über den D-Weg aufgenommen werden, stammt von (Iwata et al., 1995). Der gestrichelte Kasten umfaßt den reduktiven Teil des katalytischen Zyklus, der Rest den oxidativen Abschnitt.

1.2.2. Das Modell nach Michel (1998)

1998 analysierte Michel bis dato veröffentlichte Daten und vertrat die Meinung, daß die gesammelten Ergebnisse zusammengekommen nicht mit dem in Kapitel 1.2.1. vorgestellten klassischen Modell vereinbar sind, das auf Messungen an isolierten Rattenleber-Mitochondrien beruht. Die Interpretation der Meßergebnisse fußt auf den oben beschriebenen Annahmen, von denen wahrscheinlich die meisten nicht exakt gelten (für Details siehe Michel, 1999). So ist z.B. fraglich, ob das System wirklich im Gleichgewicht ist (Ferguson und Sorgato, 1982). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß während der reduktiven Phase bereits 2 Protonen aufgenommen werden (Mitchell und Rich, 1994).

Michel kommt zu dem Schluß, daß während des $F \rightarrow O$ Überganges nur 1 Proton gepumpt wird. Da aber unbestritten ist, daß pro Reaktionszyklus insgesamt 4 Protonen transloziert werden, muß das fehlende Proton an einer anderen Stelle im Zyklus durch das Protein transportiert werden. Er schlug hierfür den $E \rightarrow R$ Übergang vor.

Abb. 1.5. zeigt das neu vorgeschlagene mechanistische Modell, das auf den verfügbaren strukturellen, spektroskopischen sowie Mutagenese-Daten beruht und strikt das Elektroneutralitätsprinzip (Mitchell und Rich, 1994) berücksichtigt. Jeder der 4 Häm α -Reduktionsschritte ist hierbei an die Aufnahme eines Protons über den D-Weg gekoppelt. Diese Protonen (allerdings nie mehr als 2) werden in den Bereichen um die Hämpropionate zwischengespeichert und durch elektrostatische Abstoßung bei Aufnahme von Substrat-Protonen nach außen verdrängt, „gepumpt“.

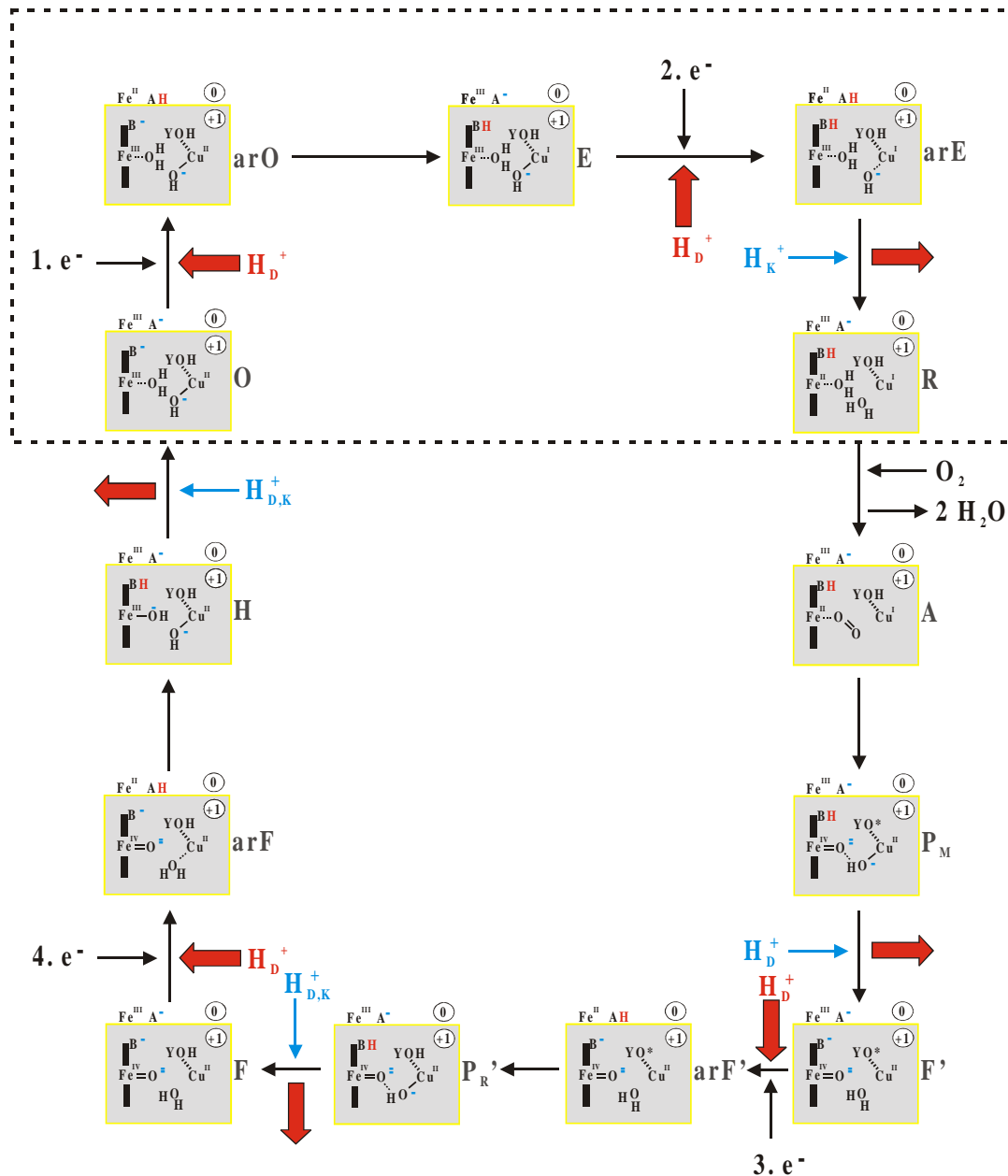


Abb. 1.5. Mechanistisches Modell für den katalytischen Zyklus von COX nach (Michel, 1998).

In den gelbumrandeten Boxen ist jeweils der binukleare Häm-Kupfer Bereich dargestellt. B⁻ steht für ein protonierbares Cluster in der Nähe des katalytischen Zentrums. Für jeden Zustand ist die Nettoladung der beteiligten Komponenten (einschließlich B⁻) in der rechten oberen Ecke angegeben. Oberhalb der Box sind jeweils das Häm *a* Eisen mit seiner formalen Oxidationszahl, A⁻ als Protonenakzeptorstelle um die Häm *a*-Propionate, sowie die Nettoladung dieser Komponenten (einschließlich A⁻) dargestellt. Rechts neben den Boxen ist jeweils die Bezeichnung des Zustandes angegeben, wobei ar (z.B. in arE) „Häm *a* reduziert“ bedeutet. e⁻ steht für Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a*, H_K⁺ für eine Protonenaufnahme über den K-Weg, H_D⁺ für solche über den D-Weg und H_{D,K}⁺ für den D- oder K-Weg. Substrat-Protonen sind blau hervorgehoben, Rot symbolisiert gepumpte Protonen. Tyr-280 ist kovalent mit His-276, einem Cu_B-Ligand, verbunden (gestrichelte Linie zwischen Cu und YOH), und bildet in manchen Zuständen ein neutrales Radikal YO*. Der mit einer gestrichelten Linie eingefasste obere Bereich wird auch als reduktiver Teil des katalytischen Zyklus bezeichnet, der Rest als oxidativer Teil.

1.2.3. Das Modell nach Wikström (2000)

Kürzlich wurde die Protonentranslokation durch Rinderherz-COX sowohl für den oxidativen als auch den reduktiven Teil des katalytischen Zyklus durch elektrische Messungen bzw. direkte Bestimmung von pH-Änderungen in einer Proteoliposomen-Suspension untersucht (Verkhovsky et al., 1999b). Diese Messungen bilden die Grundlage für Wikströms neues Modell (Wikström, 2000). Das besondere an diesem Mechanismus ist, daß Wikström von seiner bisherigen Meinung abgerückt ist, daß alle 4 Protonen während des oxidativen Teils des katalytischen Zyklus gepumpt werden. Hier nun vertritt er die Meinung, daß nur 2 Protonen in diesem Abschnitt transloziert werden, die übrigen 2 während des reduktiven Teils (siehe Abb. 1.6.). Ein erstaunlicher Aspekt ist, daß die letzteren Protonen nur gepumpt werden, wenn kurz zuvor der oxidative Teil des Zyklus durchlaufen wurde. Dies bedeutet, daß eine aktivierte Form des Enzyms existieren muß, die Energie aus der Sauerstoffumsetzung speichert und für Protonenpumpen während des reduktiven Abschnittes zur Verfügung stellt. Wikström nennt diesen Zustand $H\sim$.

Bei dem hier vorgestellten Mechanismus handelt es sich um einen neuen Histidin-Zyklus. Ein Schlüsselement hierbei ist ein Histidin-Ligand von Cu_B , wahrscheinlich His-326, der 3 Konformationen einnehmen kann:

- a) an Cu_B gebunden (in O, E, R);

Die transiente Bindung von O_2 an Cu_B , bevor es an Häm a_3 angreift, bewirkt wahrscheinlich das Abdissoziieren des His-Liganden (Woodruff et al., 1991; Verkhovsky et al., 1994), ähnlich wie dies bei CO-Bindung geschieht (Ralle et al., 1999).

- b) den dissoziierten Zustand, in dem Protonen von Glu-278 aufgenommen werden können (*input state*);

Das Glutamat kann in 2 Konformationen vorliegen: in der einen (*input state*) steht es über Wasser-Moleküle mit dem D-Weg in Kontakt und kann protoniert, in der anderen (*output state*) deprotoniert werden. Abgabe des Protons an das Histidin führt zu einer Konformationsänderung in

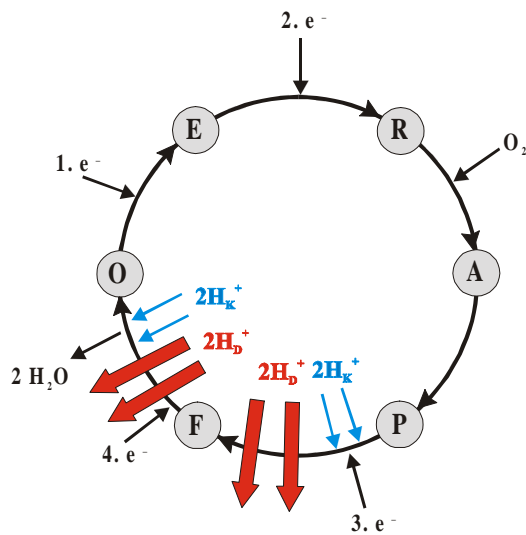
- c) den dissoziierten Zustand, in dem ein Proton an das hydrophile Cluster oberhalb der Häm-Propionate abgegeben werden kann (*output state*);

Nach Protonenabgabe kehrt das Histidin in seinen *input state* zurück ($P_M \rightarrow P_R$). Ist das Cluster dagegen bereits protoniert, kann das $ImHH^+$ sein Proton nicht abgeben, um in sein *input* Konformer zurückzukehren. Somit hat die Seitenkette von Glu-278 Zeit zu isomerisieren, Wassermoleküle können sich umordnen und ein direkter Weg zum binuklearen Zentrum wird eröffnet ($P_R \rightarrow F$; $H\sim \rightarrow (E)$).

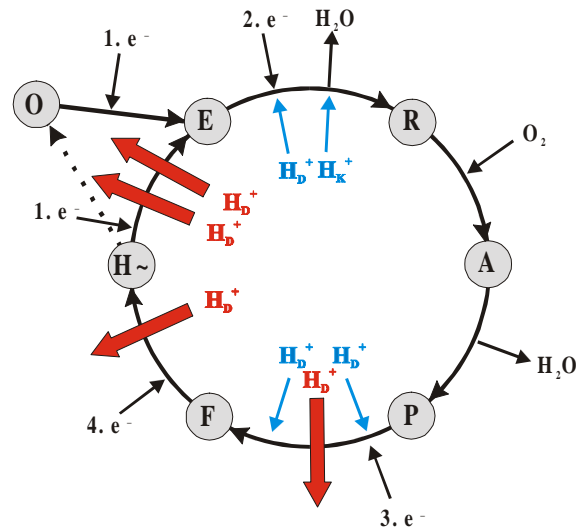
1.3. Motivation und Ziele dieser Arbeit

Wikström konnte vor mehr als 20 Jahren zeigen, daß COX eine Protonenpumpe darstellt (Wikström, 1977) und es ist eine unbestrittene Tatsache, daß pro Reaktionszyklus 4 Protonen transloziert werden (Antonini et al., 1993). Die Kristallstruktur der mitochondrialen COX aus Rinderherz (Tsukihara et al., 1995; 1996; Yoshikawa et al., 1998a; 1998b) und der bakteriellen COX aus *P. denitrificans* (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1997) wurden gelöst. Auch die unterschiedlichen Zwischenzustände des Enzyms im katalytischen Zyklus sind durch spektroskopische Methoden mehr oder weniger gut charakterisiert. Trotzdem wird nach wie vor kontrovers diskutiert, an welcher Stelle im Reaktionszyklus wieviele Protonen gepumpt werden (dicke rote Pfeile in Abb. 1.7.) und wo Substratprotonen aufgenommen werden (dünne blaue Pfeile in Abb. 1.7.). Abb. 1.7. faßt die in den vorangegangenen Kapiteln näher vorgestellten Modelle für den katalytischen Zyklus noch einmal vereinfacht dargestellt zusammen.

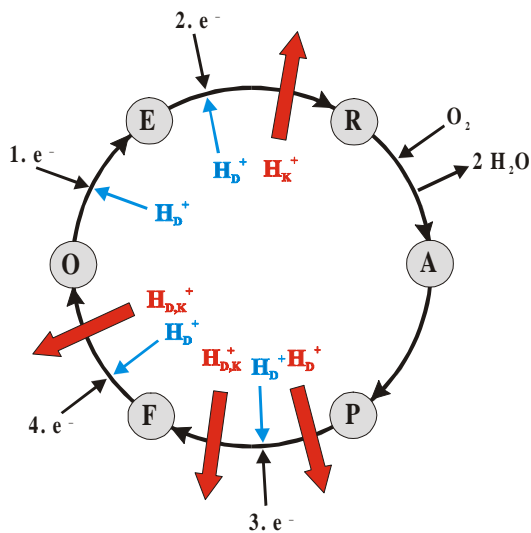
Ein weiterer Punkt, der momentan diskutiert wird, ist die Rolle der Protonen-Transportwege. Wie in Kapitel 1.1. bereits erwähnt, wurden zwei Protonen-Eintrittspfade vorgeschlagen: der K- und der D-Weg. Welcher dieser Wege aber für welches Proton genutzt wird, ist nach wie vor unklar. Das Histidin-Zyklus-Modell z.B. fordert 2 streng getrennte Wege für chemische und gepumpte Protonen (Morgan et al., 1994; Iwata et al., 1995). Aus diesem Grund wurde angenommen, der K-Weg sei für die Aufnahme der Substrat-Protonen und der D-Weg für die gepumpten Protonen zuständig. Später wurde von Konstantinov (Konstantinov et al., 1997) postuliert, daß während der reduktiven Phase des katalytischen Zyklus ($O \rightarrow R$) ausschließlich der K-Weg verwendet wird. Der D-Weg wurde für die Aufnahme sämtlicher Protonen während des oxidativen Teils des Zyklus ($R \rightarrow O$) vorgeschlagen. Im Gegensatz hierzu zeigten dynamische Studien der Protonenaufnahme an der Enzymoberfläche, daß der Eingang zum D-Weg schnell protoniert wird, während die Protonierung des K-Weges einen langen kontinuierlichen Prozeß darstellt (Karpefors et al., 1998a; Marantz et al., 1998; Sacks et al., 1998). Dies ist vereinbar mit der Röntgenstruktur, die zeigt, daß der Eingang des D-Weges von einer „protonensammelnden Antenne“, bestehend aus Carboxylaten und Histidinen, umgeben ist. Daher wurde postuliert, daß das erste Proton über den D-Weg aufgenommen wird (Michel, 1998).



klassisches Modell



Wikström 2000



Michel 1998

Abb. 1.7. Vereinfachte schematische Darstellungen kürzlich vorgeschlagener Modelle für den katalytischen Zyklus in COX.

Bis vor kurzem war allgemein akzeptiert, daß 2 Protonen während des $P \rightarrow F$ Überganges gepumpt werden und 2 weitere beim $F \rightarrow O$ Übergang (klassisches Modell, (Wikström, 1989)).

1998 postulierte Michel einen Mechanismus, bei dem jedes aufgenommene Elektron durch ein Proton kompensiert wird und 4 einzelne Protonenpumpschritte stattfinden. Ein Proton wird hierbei bereits während des $E \rightarrow R$ Übergangs transloziert (Michel, 1998).

Wikström schlug 2000 vor, daß nur 2 Protonen im oxidativen Teil des Zyklus ($R \rightarrow O$) gepumpt werden (Wikström, 2000). Die restlichen 2 Protonen werden nach Aufnahme des 1. Elektrons transloziert, jedoch nur, wenn unmittelbar zuvor der oxidative Teilzyklus durchlaufen wurde.

Aus den eben aufgeführten Darstellungen wird deutlich, daß nach wie vor die genaue Funktionsweise der COX unklar ist. Aus diesem Grund sollten elektrische Messungen an dem Enzym durchgeführt werden, da hiermit direkt elektrogene Vorgänge im Protein, wie Protonen- und Elektronentransferschritte, verfolgt werden können. Mit Hilfe der *Bilayer*-Technik sollten Teilschritte des katalytischen Zyklus genauer untersucht werden, indem bestimmte Zwischenzustände eingestellt und durch Zufuhr eines Elektrons reduziert wurden. Die Klärung der Fragen, wie viele Protonen im entsprechenden Teilschritt aufgenommen bzw. gepumpt werden und welcher der beiden Protonen-Wege jeweils Verwendung findet, stand hierbei im Mittelpunkt.

2. Materialien und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendete COX aus *P. denitrificans* wurde in den Labors von Prof. Michel und Prof. Ludwig isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierzu wurden bakterielle Membranen isoliert (Gerhus et al., 1990) und das Enzym durch Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt (Kleymann et al., 1995). Gezielte Mutagenese erfolgte wie in (Pfitzner et al., 1998) beschrieben.

2.1. Herstellung von Proteoliposomen

Bei den elektrischen Messungen an der BLM werden Liposomen mit einer Lipidkonzentration von 10 mg/ml verwendet. Zur Herstellung werden die *E. coli* Lipide [Aceton-Ether-Extrakt, AVANTI POLAR LIPIDS] am Rotationsverdampfer im Stickstoffstrom zu einem Film verblasen. Die Lipide trocknet man unter Vakuum und resuspendiert in 50 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 2% (w/v) Cholat. Zur Hydratisierung läßt man die Suspension 90 min unter Stickstoff auf Eis rühren und beschallt anschließend [BRANSON SONIFIER 250, 30% duty cycle, output control 3-4], bis die Lösung opaleszent wird (etwa 5 x 30 sec). Nun fügt man 4 µM COX hinzu (Lipid/Protein Verhältnis = 20/1) und inkubiert 15 min auf Eis.

Zur Entfernung des Detergenz werden 400 mg/ml mit Puffer gewaschene BioBeads SM 2 zugegeben und über Nacht bei 4 °C gerührt. Man tauscht gegen die halbe Menge frischer BioBeads [BIO-RAD] aus und läßt 1 h bei RT rühren. Schließlich entnimmt man die Vesikel-Suspension und zentrifugiert 2 x 5 min bei 7000 g, um große Protein-Lipid Aggregate und vom Beschallstab herrührende Titan-Partikel zu entfernen.

Die Proteoliposomen werden durch die Bestimmung der RCR (*respiratory control ratio*) gemäß (Müller et al., 1986) charakterisiert und, falls nicht sofort verwendet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.1.1. Beladen der Liposomen mit Rubpy bzw. Zn^{2+}

Das Beladen der Liposomen erfolgt nach der Gefrier/Tau-Methode. Hierzu werden 100 µl Proteoliposomen mit 100 µl 160 µM Rubpy, 600 µM EDTA, 50 mM Hepes/KOH pH 7.4 (bzw. 100 µl 200 µM ZnCl_2 , 50 mM Hepes/KOH pH 7.4) vermischt, 2 x 30 sec beschallt [BRANSON 1210] und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Man läßt die Liposomen wieder langsam auftauen, beschallt 2 x 30 sec und wiederholt den gesamten Vorgang.

Externes Rubpy/EDTA bzw. Zn^{2+} entfernt man mittels Gelfiltration. Eine $0,65\ \mu\text{m}$ Filtereinheit [MILLIPORE Ultrafree-MC, *low binding durapore membrane*] wird mit Sephadex G50 medium [PHARMACIA] (1g in 10ml Puffer 2-3 h bei RT quellen lassen) bis zum Rand gefüllt und bei $150 \times g$ 30 sec abzentrifugiert [EPPENDORF HERMLE ZK 380]. Das Filtrat wird verworfen, die Probe sofort aufgetragen und die beladenen Proteoliposomen nach Zentrifugation ($225 \times g$, 50 sec) im Filtrat gewonnen.

2.2. BLM-Messungen

2.2.1. Versuchsaufbau

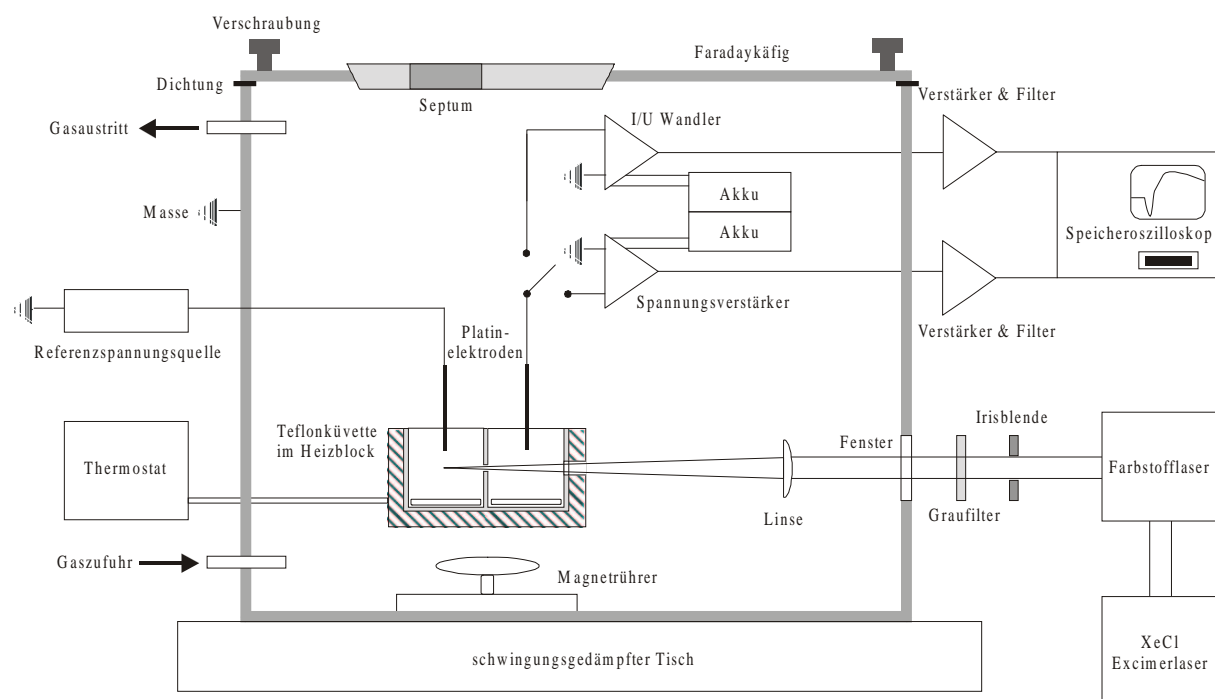


Abb. 2.1. Meßaufbau für photoelektrische Messungen an schwarzen Membranen unter anaeroben Bedingungen. Erläuterungen im Text.

Abbildung 2.1. zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Kernstück der gasdichten Apparatur ist eine Teflon-Küvette, die sich in einem temperierbaren [Flüssigkeitsthermostat LAUDA RM6] Metallhalter befindet. Die Küvette besitzt 2 Kompartimente (Fassungsvermögen je 1,5 ml), die durch ein kleines Loch mit einem Durchmesser von 0,9 mm miteinander verbunden sind. Über diese Öffnung wird ein dünner Film aus Lipid gezogen, aus dem sich nach kurzer Zeit spontan eine Lipiddoppelschicht, die BLM, ausbildet. Mit Hilfe eines Beobachtungsfernrohrs kann das optische „schwarz werden“ der Membran verfolgt werden.

Elektrisch wird die Güte der Membran mittels Kapazitäts- und Leitfähigkeitsmessung überprüft. Hierzu wird der Stromverstärker [Selbstbau unter Verwendung von Operationsverstärker 3554, BURR BROWN, TUCSON, ARIZONA] verwendet.

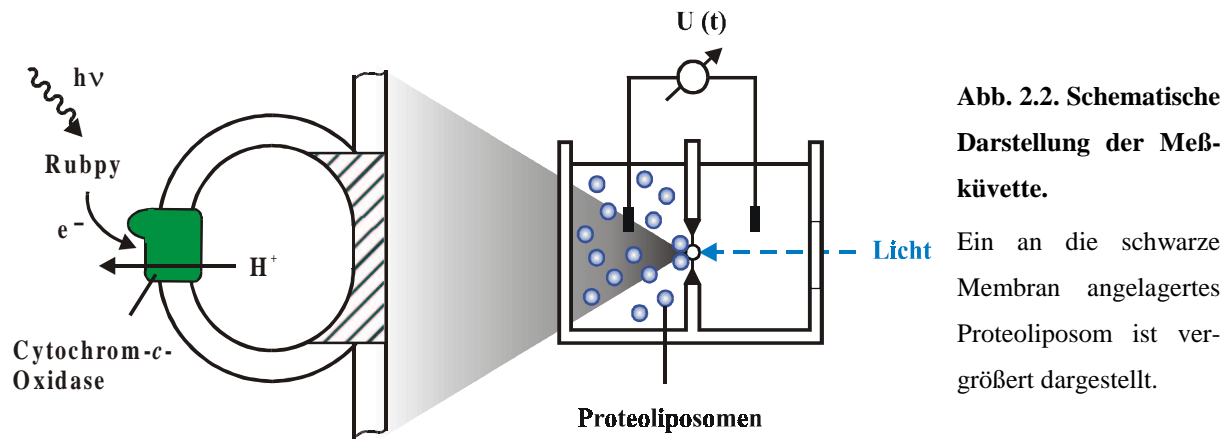


Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Meßküvette.

Ein an die schwarze Membran angelagertes Proteoliposom ist vergrößert dargestellt.

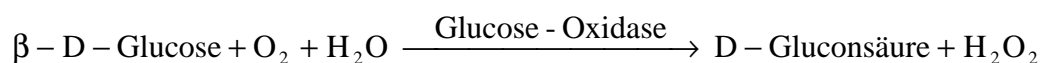
In die linke, lichtabgewandte Kammer wird die Proteoliposomen-Suspension eingerührt. Hierzu befinden sich spezielle Magnetrührer in den beiden Kompartimenten, die über ein Magnetrührgerät unterhalb des Küvettenhalters bewegt werden. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt über einen durch Licht induzierbaren Elektronendonator (siehe Abb. 2.2. und Kapitel 2.2.2.). Mit Hilfe eines XeCl-Excimerlaser [MINex, LAMDA PHYSIK, GÖTTINGEN] gepumpten Breitband-Farbstofflasers [RDP-1, RADIANT DYES LASER ACCESSORIES, WERMELSKIRCHEN] und Coumarin 2 als Farbstoff erhält man einen Lichtpuls mit einer Dauer von ca. 10 ns und einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm. Dieser trifft auf eine Irisblende, die auf die BLM abgebildet wird. Gemessen wird die Spannung, die sich aufgrund der Aufladung der schwarzen Membran durch die blitzinduzierten Ladungsbewegungen in den angelagerten Proteoliposomen zwischen den Kompartimenten der Küvette aufbaut. Sie wird durch platinierte Platinelektroden, die direkt in die beiden Kammern eintauchen, abgegriffen. Das Signal wird von einem Spannungsverstärker [Selbstbau unter Verwendung von Operationsverstärker 3554, BURR BROWN, TUCSON, ARIZONA] 200fach verstärkt, 5fach nachverstärkt und gefiltert (1 MHz) [SR560, STANFORD RESEARCH SYSTEMS, SUNNYVALE, KALIFORNIEN] und von einem digitalen Speicher-Oszilloskop [Integra 10, NICOLET INSTRUMENT TECHNOLOGIES, MADISON, WISCONSIN] aufgezeichnet.

2.2.2. Durchführung

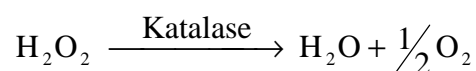
Im folgenden ist die Durchführung der elektrischen Messungen unter anaeroben Bedingungen beschrieben (= Standardbedingungen). Bei Experimenten unter aeroben Verhältnissen vereinfacht sich der Meßvorgang entsprechend, da z.B. nicht be- und entgast werden muß.

Nach gründlichem Reinigen der Küvette mit Ethanol und Hexan wird zunächst das Küvettenloch imprägniert. Hierzu wird es von beiden Seiten mit 5 µl einer 0,5% Diphytanoylphosphatidylcholin-Lösung [AVANTI POLAR LIPIDS] in Hexan behandelt. Anschließend setzt man die noch leere, ungefüllte Küvette in den temperierten (25°C) Küvettenhalter ein, schließt die Platinelektroden an und hängt sie in die Kompartimente. Es wird auf Strommessung umgestellt, die Dichtung sowie der Deckel aufgelegt und der Faradaykäfig fest verschlossen.

Man evakuiert die Apparatur für ca. 5 min mit einer Vakuumpumpe und begast anschließend etwa 20 min mit Argon (1000 cm³/min). Dann werden jeweils 1,5 ml des frisch angesetzten, zweimal entgasten und mit Argon begasten Standardpuffers (50 mM Hepes/KOH pH 7.4, 150 mM β-D-Glucose, 40 µg/ml Glucose-Oxidase [FLUKA] , 25 µg/ml Katalase [SIGMA C-100]) in die Kammern der Küvette gefüllt. Glucose-Oxidase wird zugefügt, um restlichen bzw. bei Zugaben eingeschleppten Sauerstoff gemäß folgender Gleichung zu entfernen



Da das hierbei entstehende Wasserstoffperoxid das Enzym in einen anderen, nicht gewollten Zustand überführen kann (vergleiche Kapitel 3.3. bzw. Kapitel 3.6.), enthält der Puffer weiterhin Katalase:



Nun wird über das Küvettenloch eine Membran gezogen, wobei darauf geachtet wird, daß hierbei möglichst wenig Sauerstoff eingeschleppt wird, um eine Ansäuerung durch die gebildete Gluconsäure zu minimieren. Als membranformendes Lipid findet 1,5% Diphytanoylphosphatidylcholin mit 0,025% Octadecylamin [RIEDEL-DE-HAEN] in Dekan Verwendung. Nachdem die Membran optisch schwarz geworden ist, wird ihre Leitfähigkeit ($G_m \approx 4 \text{ nS/cm}^2$) und die Membrankapazität ($C_m \approx 0,3 \text{ µF/cm}^2$) bestimmt. Nach Zugabe der Proteoliposomen (40 µl 4 µM COV, \Rightarrow Proteinendkonz. etwa 100 nM) auf der lichtabgewandten Seite läßt man etwa 60-90 min unter Rühren und Argon-Atmosphäre anlagern.

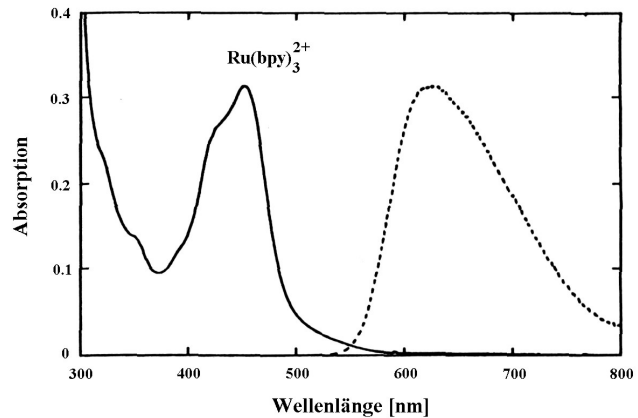
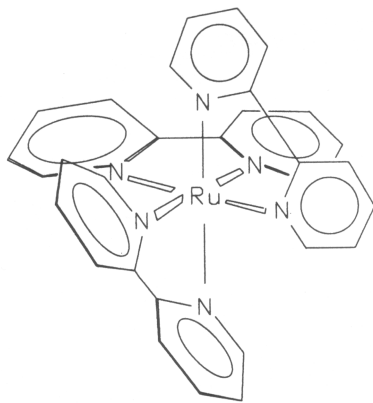


Abb. 2.3. Struktur und Absorptions- bzw. Emissionsspektrum von Rubpy (Roundhill, 1994).

Die starke Absorptionsbande um 450 nm rührt vom erlaubten Übergang eines Elektrons aus dem 4d Orbital in ein π^* -antibindendes Orbital eines Bipyridyl-Liganden (MLCT : *metal to ligand charge transfer*). Solche angeregten Zustände, die aus einem MLCT-Übergang resultieren, neigen häufig zu „externen“ Elektronentransfer-Reaktionen. Die Absorption oberhalb von 500 nm wurde einem verbotenen MLCT-Übergang zugeordnet und bewirkt die beobachtete Lumineszenz des Komplexes (gestricheltes Spektrum).

Die blitzlichtinduzierte Einelektronenreduktion der COX erfolgt mit Hilfe des Ruthenium-Komplexes Rubpy (Nilsson, 1992; Zaslavsky et al., 1993), dessen Struktur aus Abb. 2.3. ersichtlich wird. Rubpy (80 μM) bindet unter den gewählten Bedingungen (niedrige Ionenstärke, pH-Wert > 7.0) an der Cyt *c* Bindestelle. Durch einen Laserblitz (450 nm, ≈ 10 ns, $\approx 100 \text{ mJ/cm}^2$) wird Ru(II)bpy in einen angeregten Zustand Ru(II)*bpy überführt, der Cu_A in weniger als 1 μs reduziert (Nilsson, 1992). Um die Elektroneninjektion in COX irreversibel zu gestalten, muß ein geeigneter Elektronendonator D zugefügt werden, der das gebildete Ru(III)bpy wieder reduziert (siehe Abb. 2.4). Hierfür wird 300 μM EDTA verwendet (Pan et al., 1993).

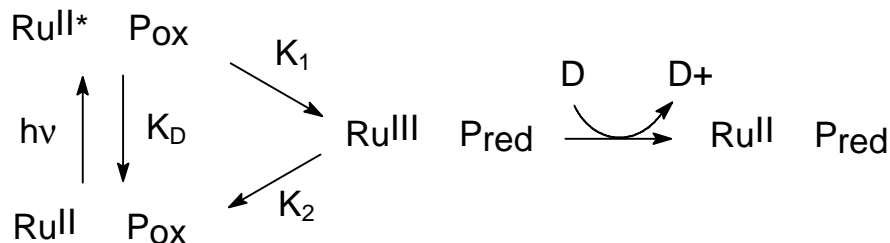


Abb. 2.4. Reaktionsschema von Rubpy nach (Geren et al., 1991)

Nach Lichtanregung gelangt der Rutheniumkomplex in den angeregten Zustand ($\text{Ru}^{\text{II}*}$) und kann ein Elektron an ein oxidiertes Enzym (P_{ox}) abgeben, daß dabei reduziert wird (P_{red}). Um den Elektronenrücktransfer vom Protein auf das gebildete Ru^{III} zu verhindern, wird ein Elektronendonator (D) zugesetzt, der den Rutheniumkomplex wieder reduziert.

2.2.3. Elektrische Eigenschaften der Verbund-Membran

Die elektrischen Eigenschaften der BLM wurden in früheren Arbeiten bereits ausgiebig besprochen (Bamberg et al., 1979; Borlinghaus et al., 1987; Fahr et al., 1981; Holz, 1990; Läger, 1991) und sollen daher hier nur kurz angerissen werden.

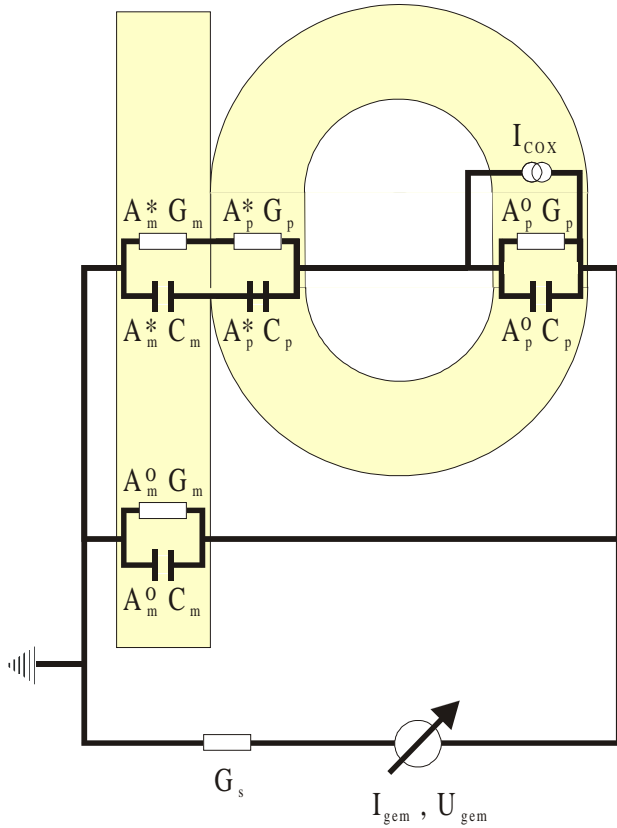


Abb. 2.5. Ersatzschaltbild der BLM mit angelagerten Proteoliposomen.

Blitzlichtinduzierter Elektronentransfer von Rubpy auf die Oxidase führt zu einem transienten Strom $I_{\text{cox}}(t)$. Im externen Meßkreis wird ein zeitabhängiger Strom $I_{\text{gem}}(t)$ registriert.

A_m^o =unbedeckte BLM-Fläche

A_p^o =freie Membranfläche angelagerter Liposomen

$A_m^* = A_p^*$ =Kontaktfläche angelagerte Liposomen/BLM

C_p =spez. Kapazität der Proteoliposomen

G_p =spez. Leitfähigkeit der Proteoliposomen

C_m =spez. Kapazität der BLM

G_m =spez. Leitfähigkeit der BLM

$1/G_s$ =Serienwiderstand des Meßkreises

I_{cox} =von der Oxidase generierter Strom

I_{gem} =gemessener Strom

U_{gem} =gemessene Spannung

Die Analyse des Ersatzschaltbildes in Abb. 2.5. liefert für Strommessungen zwei Systemzeitkonstanten τ_e und τ_0 . Diese legen das Zeitfenster fest, in dem Messungen mit der BLM-Methode durchgeführt werden können.

Für die Systemzeit τ_0 erhält man:

$$(2.1.) \quad \tau_0 = \frac{A_p^o C_p + \frac{1}{A_m^* C_m} + \frac{1}{A_p^* C_p}}{A_p^o G_p + \frac{1}{A_m^* G_m} + \frac{1}{A_p^* G_p}}$$

Die Systemzeit τ_0 beträgt unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen etwa 250 ms und beschränkt die Zeitauflösung des Meßsystems zu großen Zeiten. Durch den Zugriffswiderstand $1/G_s$ sowie die Gesamtkapazität der Membran wird die Zeitauflösung zu kleinen Zeiten begrenzt (τ_e) und beträgt unter den gewählten Bedingungen (Platinelektroden direkt in der Küvette, Puffer: 50 mM Hepes/KOH pH 7.4, Filter: 1MHz) etwa 20 μ s.

Bei Spannungsmessungen gilt Gleichung 2.1. nicht mehr, da dann für die Systemzeit τ_0 zusätzlich der unbedeckte Teil der BLM eine Rolle spielt. Trotzdem ist auch hier diese Zeitkonstante im Allgemeinen ähnlich derjenigen bei der Strommessung (Borlinghaus et al., 1987). Da der Spannungsverstärker mit einem hohen Eingangswiderstand (1 G Ω) versehen ist, liegt τ_e bei der Spannungsmessung in der Größenordnung von 10 s und stellt somit keine Limitierung zu kurzen Zeiten dar. Der untere Wert des Zeitfensters wird deshalb durch die Meßelektronik bestimmt. Für das verwendete System wurde unter den gegebenen Bedingungen eine Zeitauflösung von etwa 1 μ s bestimmt.

Aus dem Ersatzschaltbild in Abb. 2.5. kann weiterhin eine Beziehung zwischen dem von der Oxidase generiertem Strom $I_{COX}(t)$, dem gemessenen Strom $I_{gem}(t)$ und der Spannung $U(t)$ hergeleitet werden:

Der gesamte katalytische Zyklus wird in bakterieller COX in weniger als 2 ms durchlaufen. Da somit $t \ll \tau_0$ ist, sind die Bedingungen für ideale kapazitive Kopplung erfüllt und nur die spezifischen Kapazitäten C_p und C_m der Proteoliposomen-Membran bzw. der BLM müssen bei der Signalanalyse berücksichtigt werden. Weiterhin spielen die Gesamtfläche A_m der BLM, die mit Liposomen bedeckte Fläche A_m^* , die Kontaktfläche angelagerte Proteoliposomen/BLM $A_p^* \approx A_m^*$ sowie die freie Membranfläche A_p^o der angelagerten Liposomen eine Rolle.

Für die Beziehung zwischen $I_{COX}(t)$ und $I_{gem}(t)$ erhält man (Läuger, 1991):

$$(2.2.) \quad I_{COX}(t) = \left[1 + \rho \left(1 + \frac{C_p}{C_m} \right) \right] I_{gem}(t)$$

$$\text{mit } \rho = \frac{A_p^o}{A_p^*}$$

Der gemessene Strom ist also dem von der Oxidase erzeugten Strom proportional.

Für Strom- und Spannungsmessungen kann folgender Zusammenhang hergeleitet werden (Läuger, 1991):

$$(2.3.) \quad I_{\text{COX}}(t) = -AC_m H \frac{dU_{\text{gem}}}{dt}$$

$$\text{mit } H = (1 + \rho)(1 - \sigma) + \rho \frac{C_p}{C_m} \text{ und } \sigma = \frac{A_m^*}{A_m}$$

Der gemessene Strom ist somit direkt proportional zur Ableitung der gemessenen Spannung nach der Zeit.

2.2.4. Datenanalyse

Teilschritte des katalytischen Zyklus der COX lassen sich als eine Folge von Reaktionen erster Ordnung beschreiben, wobei eine beliebige Zahl dieser Reaktionen elektrogen ist. Die erhaltenen elektrischen Signale lassen sich somit durch eine Summe von Exponentialfunktionen anpassen

$$(2.4.) \quad U_{\text{fit}}(t) = \sum_i^N A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} + C$$

Die Amplituden A_i und die Zeitkonstanten τ_i stellen hierbei unabhängige Fitparameter dar.

Zur Auswertung der Meßdaten wurden das Fitprogramm Origin 5.0 [Microcal] bzw. bei mehr als 3 Exponentialfunktionen das Programm SPLMOD (Provencher und Vogel, 1983) verwendet.

2.3. Spektroskopische Messungen

Zur Überprüfung und Charakterisierung von eingestellten Zwischenzuständen des katalytischen Zyklus wurden Absorptionsspektren im UV-Vis Bereich mit dem Spektrophotometer U-3000 [HITACHI] aufgenommen. Die Überprüfung der Enzymaktivität bzw. der RCR von Proteoliposomen erfolgte an demselben Gerät im *Time-Scan*-Modus.

Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Kinetik des Elektronentransfers von Rubpy auf *P. denitrificans* COX wurden an einer im Hause gebauten Blitzlicht-Photolyse-Apparatur (siehe Abb. 2.6.) durchgeführt.

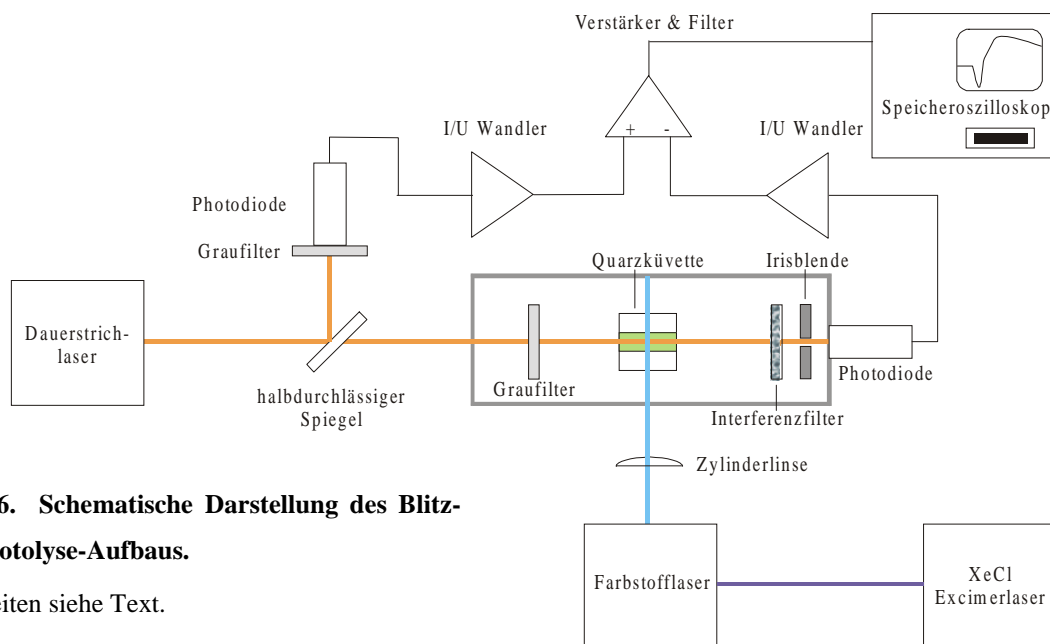


Abb. 2.6. Schematische Darstellung des Blitzlicht-Photolyse-Aufbaus.

Einzelheiten siehe Text.

Der Strahl eines durchstimmbaren Dauerstrichlasers [LASER2000] wird nach Abschwächung durch einen Graufilter auf die verschließbare Quarzküvette (10 x 4 mm) fokussiert und das transmittierte Licht nach Durchgang durch einen Schmalband-Interferenzfilter (606,3 nm) von einer Photodiode detektiert. Das Signal wird vorverstärkt [427 CURRENT AMPLIFIER, KEITHLEY INSTRUMENTS, CLEVELAND, OHIO; 10^5 V/A] und im Nachverstärker [SR560, STANFORD RESEARCH SYSTEMS, SUNNYVALE, KALIFORNIEN; 10x] mit 100 kHz lowpass gefiltert. Um Laserlichtfluktuationen (ca. 1%) auszugleichen, wird vor der Probe ein Referenzstrahl ausgekoppelt, dessen Signal durch Verwendung von Graufiltern auf die gleiche Spannung wie die des Meßstrahls gebracht und das Differenzsignal von einem digitalen Speicher-Oszilloskop [Integra 10, NICOLET, MADISON, WISCONSIN] aufgezeichnet wird. Für die Blitzlicht-Photolyse wird ein XeCl-Excimerlaser [LPX100, LAMDA PHYSIK, GÖTTINGEN] gepumpter Breitband-Farbstofflaser [FL105, LAMDA PHYSIK, GÖTTINGEN] mit Coumarin 2 als Farbstoff verwendet ($\lambda = 450$ nm, Pulsdauer ca. 10 ns, Energie ≈ 9 mJ).

2.4. Herstellung von *caged*-Sauerstoff

2.4.1. Synthese von (μ -superoxo)bis[pentaammincobalt(III)], saures Sulfat

Die Darstellung von $[(\text{NH}_3)_5\text{Co}^{\text{III}}(\text{O}_2)^{-\text{I}}\text{Co}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5](\text{SO}_4)_2 \bullet \text{HSO}_4 \bullet 3\text{H}_2\text{O}$ erfolgt nach (Gleu und Rehm, 1938). 50 ml 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 ml 1M CoSO_4 , 100 ml konz. NH_3 , 50 ml 1M H_2O_2 , 100 ml H_2O und 50 ml 1M $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ werden in der angegebenen Reihenfolge in Zeitabständen von ca. 10 sec vermischt, wobei man nach jedem Zusatz gut durchrührt. Anschließend läßt man 10-15 min ruhig stehen, dekantiert den größten Teil der überstehenden Flüssigkeit und filtriert den feinkristallinen grünen Niederschlag ab. Dieser wird zunächst mit Ether, dann mit Alkohol gewaschen und trocken gesaugt. Das Rohprodukt (5-7 g) wird in der 25fachen Menge 2N H_2SO_4 durch Erhitzen auf 80-85°C möglichst schnell gelöst, die Lösung sofort filtriert und 1 Tag zur Kristallisation stehen gelassen. Nach dem Waschen mit Ethanol und Ether erhält man 3-5 g Reinprodukt in Form von prachtvollen großen grünschwarzen glänzenden Prismen.

2.4.2. Synthese von (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)]

Die Darstellung von $[(\text{bpy})_2\text{Co}^{\text{III}}(\text{O}_2)^{-\text{II}}(\text{OH})^{-\text{I}}\text{Co}^{\text{III}}(\text{bpy})_2](\text{NO}_3)_3$ erfolgt nach (MacArthur et al., 1995). 50 ml 1M bpy in Ethanol und 50 ml 0,5M $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$ in Wasser werden vermischt und auf pH 9,0 eingestellt. Anschließend begast man 30 min im Dunkeln mit reinem Sauerstoff und fügt 50 ml 1M $\text{NaClO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$, gelöst in 50 % Ethanol / 50 % Wasser, langsam hinzu. Man läßt die Lösung 24 h bei 10°C im Dunkeln ruhen, filtriert den braunen feinkristallinen Niederschlag ab und wäscht mit kaltem Ethanol. Nach dem Trocknen erhält man das Reinprodukt in nahezu 100 % Ausbeute.

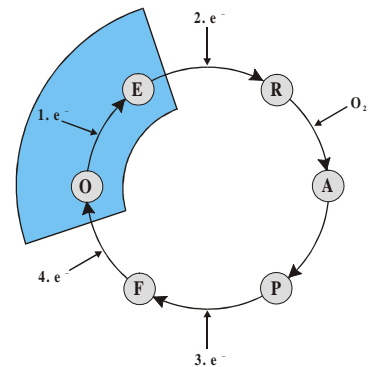
3. Ergebnisse

Wie in der Einleitung bereits beschrieben wurde, ist bisher der genaue Mechanismus der Sauerstoff-Reduktion in COX noch nicht aufgeklärt. Zeitaufgelöste Messungen des Ladungstransfers durch COX sollen wertvolle Hinweise zur Klärung der Frage liefern, wie der Elektronentransport mit dem Protonentransfer gekoppelt ist, und wo im katalytischen Zyklus Protonen aufgenommen bzw. gepumpt werden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit elektrische Messungen mit der BLM-Technik durchgeführt. Hierzu wurde versucht, die unterschiedlichen Zustände im katalytischen Zyklus des Enzyms einzustellen, um durch Zufuhr eines Elektrons einen Teilschritt des Zyklus genauer zu untersuchen.

3.1. Der O → E Übergang

3.1.1. Einstellen des vollständig oxidierten Zustandes O

Isolierte COX liegt normalerweise vollständig im oxidierten Zustand vor. Nach Rekonstitution in Liposomen kann es vorkommen, daß das Enzym durch endogene Reduktionsmittel in den Lipiden teilweise in andere Zustände überführt wird.



Insbesondere Mutanten der COX liegen oft teilweise reduziert vor. Aus diesem Grund wurde Ferricyanid zugesetzt. Dieses Agens ist in der Lage, die Oxidase wieder vollständig zu reoxidieren (Mitchell et al., 1992a). Abb. 3.1. (A) zeigt die typischen Absorptionsspektren von oxidiertem und mit Dithionit reduzierter WT COX. Das oxidierte Enzym besitzt eine charakteristische Soret-Bande bei 425 nm und eine α -Bande bei 598 nm. Diese sind im reduzierten Protein nach 445 nm bzw. 605 nm verschoben. Die Differenzspektren Ferricyanid-behandelter WT COX minus COX vor der Behandlung sowie zweier Mutanten ist in Abb. 3.1. (B) dargestellt. An der negativen Bande bei 605 nm kann man erkennen, daß die verschiedenen Präparationen vor der Einwirkung des Ferricyanids unterschiedlich stark reduziert vorlagen. Eine Behandlung mit Ferricyanid ist also wichtig, um einen definierten volloxydierten Zustand zu erhalten. Hierbei ist zu beachten, daß in Liposomen rekonstituierte COX, insbesondere Mutanten, längere Zeit bis zur vollständigen Reoxidation benötigen (bis zu mehreren h).

Im Folgenden wurde immer (wenn nicht anders angegeben) 200 μ M Ferricyanid zugesetzt.

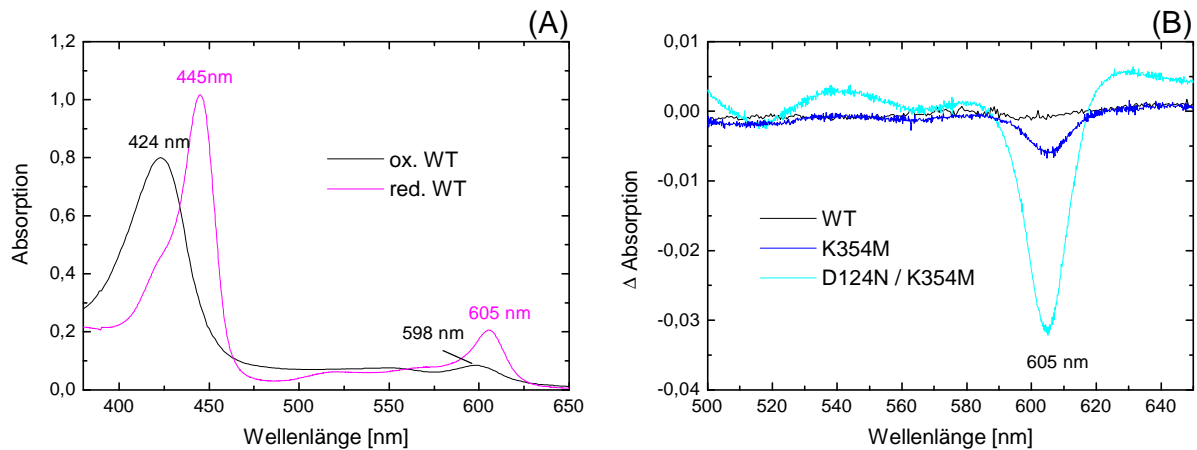


Abb. 3.1. UV/Vis-Spektren von oxidiertem und reduziertem COX.

(A) Absorptionsspektren vor und nach der Zugabe einiger Körnchen Natriumdithionit zum WT Enzym.

(B) Differenzspektren Ferricyanid-behandelter Oxidase minus unbehandeltem Enzym. Während beim solubilisierten WT-Enzym die Zugabe von 200 μM Ferricyanid keinen Effekt hat, zeigen die Mutanten eine mehr oder weniger große negative Bande bei 605 nm. Dies deutet darauf hin, daß die Proteine nach der Präparation unterschiedlich stark reduziert vorliegen.

Die Enzymkonzentrationen betragen jeweils 5 μM . Puffer: 50 mM Hepes/KOH pH 7.4, 0.05 % LM.

3.1.2. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen

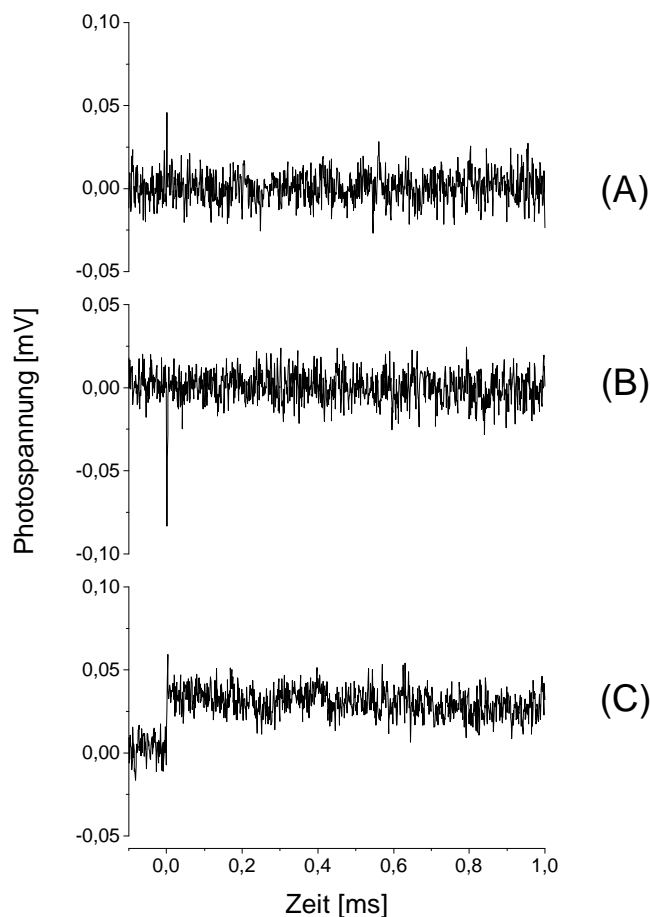


Abb. 3.2. Verschiedene Artefakte bei Spannungsmessungen.

(A) Laserartefakt vor Zugabe von Protein bzw. Rubpy. Tritt nur auf, wenn der Laserstrahl nicht optimal auf die Membran fokussiert ist.

(B) Rubpy-Artefakt nach Laserpuls in Abwesenheit von Proteoliposomen.

(C) Spannungsänderung nach gepulster Belichtung an die BLM angelagerter COX-Liposomen in Abwesenheit von Rubpy.

Alle Messungen in diesem Kapitel wurden, wenn nicht anders angegeben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 mM Hepes/KOH pH 7.4, 150 mM β -D-Glucose, 40 $\mu\text{g/ml}$ Glucose-Oxidase, 25 $\mu\text{g/ml}$ Katalase, Argon-Atmosphäre. $T=25^\circ\text{C}$.

Führt man Spannungsmessungen durch und blitzt mit einer Laserenergie von ca. 100 mJ/cm^2 (450 nm) auf die BLM, so erhält man meist ein kleines, schnelles Laserartefakt (Abb. 3.2. (A)). Dieses bleibt unverändert, wenn „leere“ Liposomen, die kein Protein besitzen, an die BLM angelagert und belichtet werden. Ist dagegen der Laserstrahl optimal auf die BLM fokussiert und die in die Küvette eintauchenden platiniierten Platinelektroden gut lichtgeschützt angebracht, kann in manchen Fällen dieses Artefakt verhindert werden.

Rührt man $80 \text{ }\mu\text{M}$ Rubpy und $300 \text{ }\mu\text{M}$ EDTA in die lichtabgewandte Küvettenkammer ein, so erhält man nach Lichtaktivierung ein schnelles Signal mit negativem Vorzeichen (Abb. 3.2. (B)). Dieses ist wahrscheinlich auf die Rubpy-Photolyse in der Nähe der BLM zurückzuführen.

Läßt man Proteoliposomen (Enzymkonz. in der Küvette ca. 100 nM) an die BLM anlagern (Anlagerungszeit ca. 1h), so führt die gepulste Laserbestrahlung in Abwesenheit des Elektronendonors Rubpy zu einem kleinen, schnellen ($\tau < 1 \mu\text{s}$) Spannungsanstieg (Abb. 3.2. (C)), der mit der Systemzeit $\tau_0 \approx 250 \text{ ms}$ wieder relaxiert. Dieses Signal ist vermutlich das Ergebnis einer lichtinduzierten strukturellen Änderung in der Nachbarschaft von Häm a_3 in COX (Hallén et al., 1993; Hallén und Brzezinski, 1994) und kann bei den folgenden Spannungsmessungen vernachlässigt werden, da das Artefakt sehr viel kleiner als das Meßsignal ist.

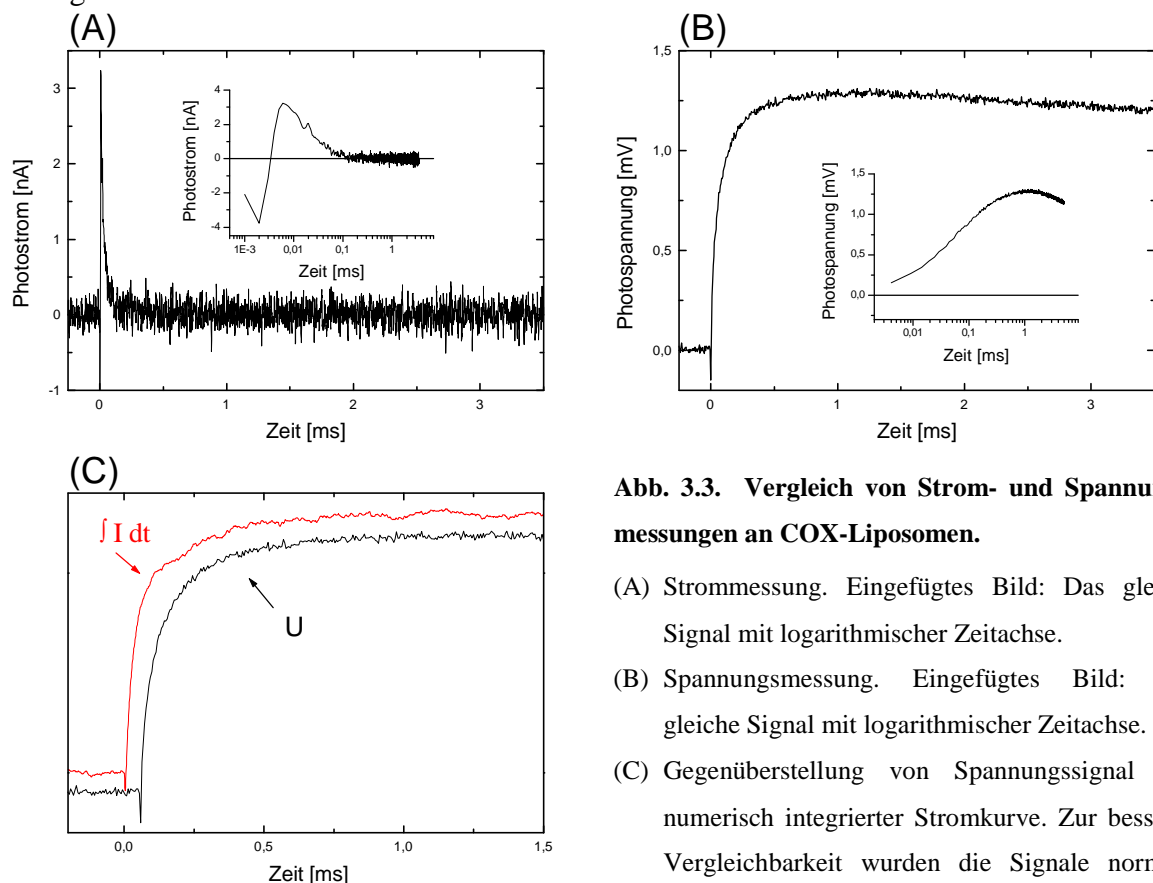


Abb. 3.3. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen an COX-Liposomen.

- (A) Strommessung. Eingefügtes Bild: Das gleiche Signal mit logarithmischer Zeitachse.
- (B) Spannungsmessung. Eingefügtes Bild: Das gleiche Signal mit logarithmischer Zeitachse.
- (C) Gegenüberstellung von Spannungssignal und numerisch integrierter Stromkurve. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Signale normiert und etwas versetzt dargestellt.

Bei den Spannungsmessungen an Proteoliposomen in Gegenwart von Rubpy kann nach dem Laserblitz zum Zeitpunkt Null in den meisten Fällen zunächst eine sehr schnelle Transiente mit negativem Vorzeichen beobachtet werden (Abb. 3.3. (B)). Diese tritt wie bereits erwähnt auch bei Messungen an Liposomen ohne Enzym auf (Abb. 3.2. (B)). Es handelt sich hierbei also wahrscheinlich um ein Artefakt der Rubpy-Photolyse in der Nähe der BLM. Anschließend wird ein elektrisches Potential über der Membran ausgebildet, dessen Vorzeichen einem Transport von positiven Ladungen von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der COX und/oder negativen Ladungen in der entgegengesetzten Richtung entspricht. Der Anstieg des Signals läßt sich durch 2 Exponentialfunktionen beschreiben, die Zeitkonstanten von etwa 20 μ s und 175 μ s mit relativen Amplituden von ca. 60 % bzw. 40 % liefern (siehe Kapitel 3.1.5.). Schließlich fällt die Spannung mit der Systemzeit wieder ab.

Bei Strommessungen (Abb. 3.3. (A)) erhält man ebenfalls zunächst eine negative Transiente (Rubpy-Artefakt), gefolgt von einem schnellen Anstieg und einer biphasischen Relaxation mit Zeitkonstanten von ebenfalls etwa 20 μ s und 175 μ s. Die relativen Amplituden betragen hierbei ca. 93 % bzw. 7 %.

Numerische Integration des Stromsignals liefert nach Normierung eine mit der Spannungsmessung nahezu identische Kurve (Abb. 3.3. (C)) und bestätigt den in Kapitel 2.2.3. theoretisch hergeleiteten Zusammenhang zwischen Strom- und Spannungsmessung (Gleichung 2.8.).

Strommessungen liefern in vielen Fällen kleinere Signale als in Abb. 3.3. (A) gezeigt. Da mit 1 MHz gefiltert werden muß, um eine Zeitauflösung von etwa 20 μ s zu erhalten, ist das Signal/Rausch-Verhältnis entsprechend schlecht. Langsamere Zeiten, die eine kleine Amplitude besitzen, können gar nicht oder nur sehr ungenau registriert werden. Die Signalgüte kann durch Mitteln mehrerer Signale verbessert werden. Problematisch hierbei ist allerdings, daß durch häufiges Blitzen die Gefahr wächst, ein Gemisch unterschiedlich stark reduzierter Proteine zu erzeugen, was wiederum die Meßergebnisse verfälscht.

Aus diesen Gründen wurden im folgenden nur noch Spannungsmessungen durchgeführt (Ausnahme: Kapitel 3.1.3.), die unter den genannten Bedingungen ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis und eine Zeitauflösung von ca. 1 μ s besitzen.

3.1.3. Abhängigkeit der Signalgröße von der Rubpy-Konzentration

Abb. 3.4. zeigt die Abhängigkeit von Spitzenstrom und Spitzenspannung von der Rubpy-Konzentration beim $O \rightarrow E$ Übergang. Hieraus läßt sich eine Halbsättigungskonzentration $K_{0.5} = 19 \mu\text{M}$ bestimmen. Beim Variieren der Rubpy-Konzentration ändern sich die Signalform und mit ihr die Zeitkonstanten und relativen Amplituden nicht. Die Menge an Rubpy ist bei der Elektronenabgabe an das Enzym folglich vermutlich nicht geschwindigkeitsbestimmend, sondern legt nur die Zahl der Oxidase-Moleküle fest, die nach dem Laserpuls ein Elektron erhalten.

Im Folgenden wird immer mit einer Rubpy-Konzentration von $80 \mu\text{M}$ gearbeitet, bei der man sich nahezu in Sättigung befindet und die Signalgröße somit optimal ist.

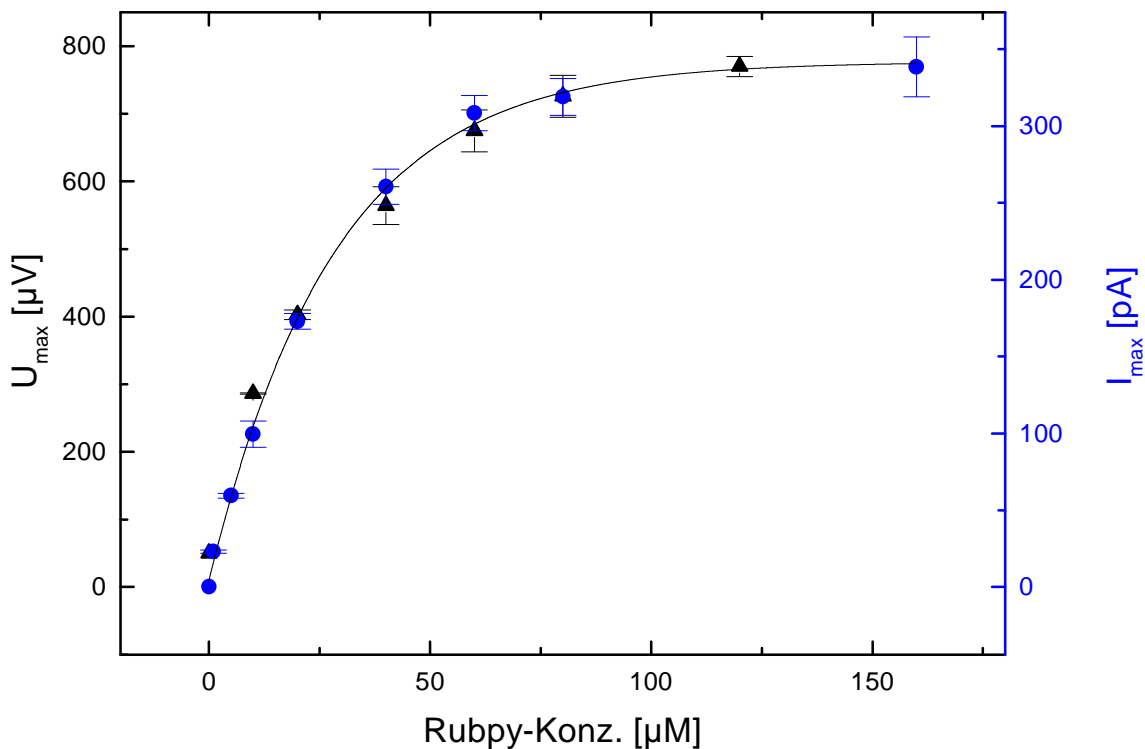


Abb. 3.4. Abhängigkeit der Signalgröße von der Rubpy-Konzentration bei Strom- und Spannungsmessungen.

Auch hier zeigt sich, daß Strom- (blaue Meßpunkte) und Spannungsmessungen (schwarze Dreiecke) dieselben Resultate liefern. Standardbedingungen und –puffer.

3.1.4. Überprüfung der Membranpermeabilität für Rubpy

Schließt man Rubpy/EDTA in Liposomen ein und trennt den extern vorhandenen Elektronendonator mittels Gelfiltration ab, kann nach Anlagerung an die BLM und Lichtanregung das in Abb. 3.5. gezeigte Signal erhalten werden. Ein Vergleich mit Abb. 3.3. (B) (Rubpy extern) zeigt, daß Rubpy-Artefakt und Signal nun entgegengesetztes Vorzeichen besitzen. Der Rutheniumkomplex ist somit nicht membrangängig und regt demnach nur die COX-Population an, die so in die Liposomen eingebaut ist, daß dessen Cyt *c* Bindestelle dem Elektronendonator zugänglich ist.

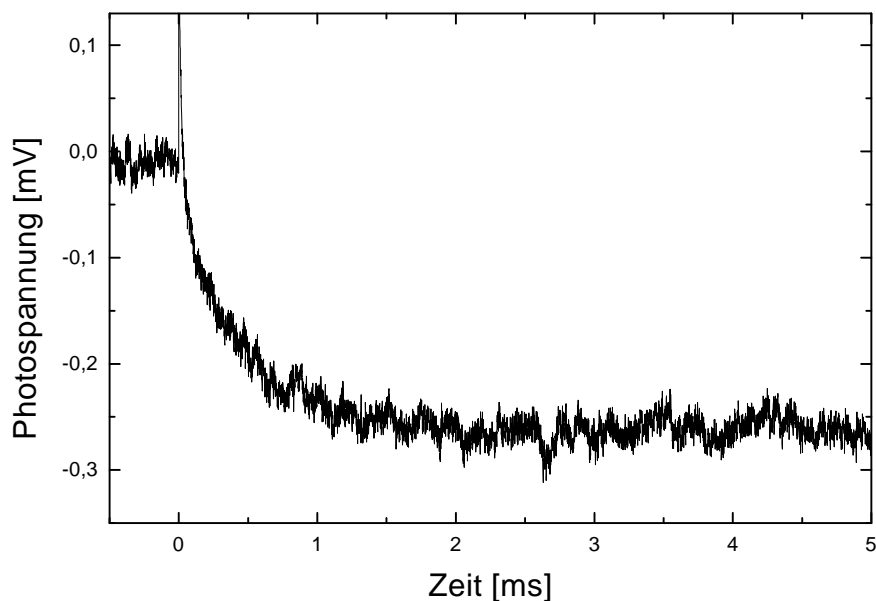


Abb. 3.5. Lichtinduzierte Spannungsänderungen, gemessen an Proteoliposomen mit eingeschlossenem Rubpy.

Im Vergleich zu Messungen mit externem Rubpy dreht sich das Vorzeichen des Signals um. Standardbedingungen und -puffer.

3.1.5. Einfluß von D₂O auf die Kinetik des O → E Übergangs

Abb. 3.6. vergleicht die elektrischen Signale, die mit Vorgängen während des O → E Übergangs in H₂O (schwarz dargestellt) bzw. D₂O (violett) verknüpft sind. In H₂O erhält man die schon in Abb. 3.3. (B) gezeigte Kurve, bei der im Anstieg zwei Phasen ($\tau_1 \approx 20 \mu\text{s}$, $\tau_2 \approx 175 \mu\text{s}$) beobachtet werden können. Fügt man 2 mM KCN hinzu, so verschwindet die langsame Phase vollständig, während die schnelle unbeeinflusst bleibt. Da Cyanid am binuklearen Zentrum bindet und alle Vorgänge dort blockiert, ist die 175 μs -Phase wahrscheinlich mit Prozessen am katalytischen Zentrum verknüpft, die 20 μs -Phase dagegen nicht.

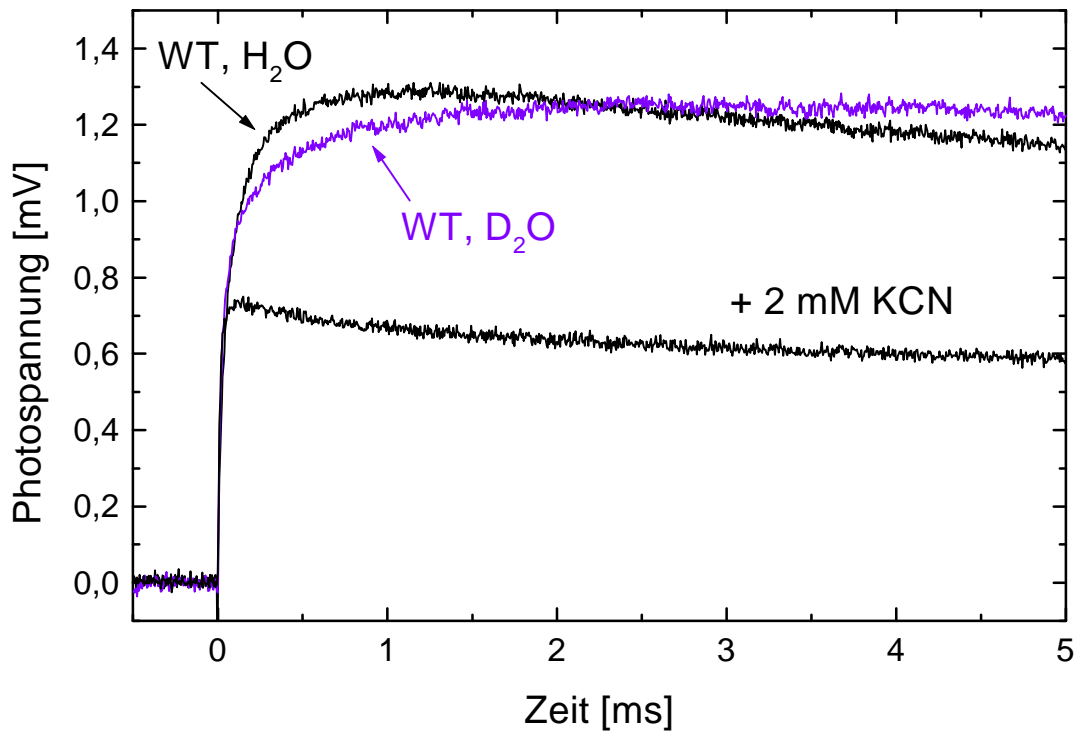


Abb. 3.6. Vergleich von Spannungsmessungen in H₂O und D₂O.

Nach Aufnahme eines Signals (WT, H₂O) wurde Kaliumcyanid zugefügt und im Anschluß an eine 5 minütige Inkubation eine zweite Kurve (+ 2 mM KCN) aufgezeichnet (Standardpuffer + 200 µM Ferricyanid). Die violette Spur zeigt den Effekt von D₂O auf die langsame Phase (Standardpuffer + 200 µM Ferricyanid in D₂O hergestellt). Diese Messungen wurden bei einem pH-Wert von 7.4 durchgeführt, der pD-Wert liegt somit um etwa 0.4 Einheiten höher.

Führt man dasselbe Experiment in D₂O durch (violetttes Signal in Abb. 3.6.), wobei auch die Proteoliposomen in schwerem Wasser präpariert wurden, wird die langsame Phase um einen Faktor 2-3 verlangsamt. Dies liegt in einem typischen Bereich für einen kinetischen Deuterium-Isotopeneffekt (Hallén et al., 1994) und legt nahe, daß der Prozeß mit Protonentransport verknüpft ist. Die schnelle Phase dagegen bleibt unverändert, was darauf hindeutet, daß es sich um eine Elektronenübertragung handelt. Auch in D₂O bleibt nach Cyanid-Bindung die 20 µs-Phase vollständig erhalten, die langsame Phase dagegen wird komplett inhibiert. Der schnelle Prozeß kann somit in Übereinstimmung mit (Konstantinov et al., 1997), die eine 15 µs-Phase für die Reduktion von Häm *a* durch Cu_A während des F → O Übergangs in *Rb. sphaeroides* fanden, als Elektronentransfer von Cu_A nach Häm *a* interpretiert werden.

Isotopeneffekt, Amplituden, Vorzeichen und KCN-Sensitivität der langsamen Phase τ_2 des Signals deuten darauf hin, daß während des O → E Übergangs ein Proton von der intrazellulären Seite der COX aufgenommen wird. Diese Vermutung wird unterstützt durch Messungen an mutierten Enzymen (siehe Kapitel 3.1.6.).

Tabelle 3.1. faßt die erhaltenen Ergebnisse noch einmal zusammen.

Reaktion	WT, H ₂ O		WT, D ₂ O	
O → E	$\tau_1 = 21,7 \pm 5,5 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 0,57 \pm 0,10$	$\tau_1 = 20,6 \pm 4,6 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 0,67 \pm 0,15$
	$\tau_2 = 176 \pm 50 \mu\text{s}$	$\alpha_2 = 0,43 \pm 0,10$	$\tau_2 = 352 \pm 71 \mu\text{s}$	$\alpha_2 = 0,33 \pm 0,15$
+ KCN	$\tau_1 = 20,9 \pm 5,0 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 1$	$\tau_1 = 20,2 \pm 4,7 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 1$

Tab. 3.1. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den O → E Übergang in H₂O und D₂O.

Deutliche Unterschiede zum WT, H₂O sind rot hervorgehoben.

3.1.6. Einfluß von Punktmutationen auf Vorgänge während des O → E Übergangs

Wie in der Einleitung besprochen (Kapitel 1.1.), besitzt die bakterielle COX 2 Transferwege, die Protonen aus dem Cytoplasma zum katalytischen Zentrum bzw. in Richtung Periplasma transportieren. Wird während des O → E Übergangs tatsächlich ein Proton von der cytoplasmatischen Seite aufgenommen, wie die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.5. vermuten lassen, so müßte sich bei Enzympräparationen, in denen durch gezielte Mutation einer der beiden Protonen-Wege verändert oder gar inaktiviert wurde, das elektrische Signal von dem des Wildtyps signifikant unterscheiden. Aus diesem Grund wurde das Experiment aus Kapitel 3.1.5. mit D- bzw. K-Weg-Mutanten wiederholt.

3.1.6.1. D-Weg-Mutanten

Tauscht man Asp-124 am Eingang des D-Weges durch ein Asparagin aus, so ist die Protonenaufnahme über diesen Pfad blockiert (Smirnova et al., 1999). Auch der Aminosäurerest Glu-278 nimmt eine Schlüsselrolle im D-Weg ein und der Austausch gegen ein Glutamin beeinflusst die Protonenaufnahme über diese Route beträchtlich (siehe Übersichtsartikel (Brzezinski und Adelroth, 1998)). Diese Tatsachen sollten genutzt werden, um mit Hilfe elektrischer Messungen an den genannten Mutanten-Enzymen zu überprüfen, ob der D-Weg während des O → E Übergangs benötigt wird.

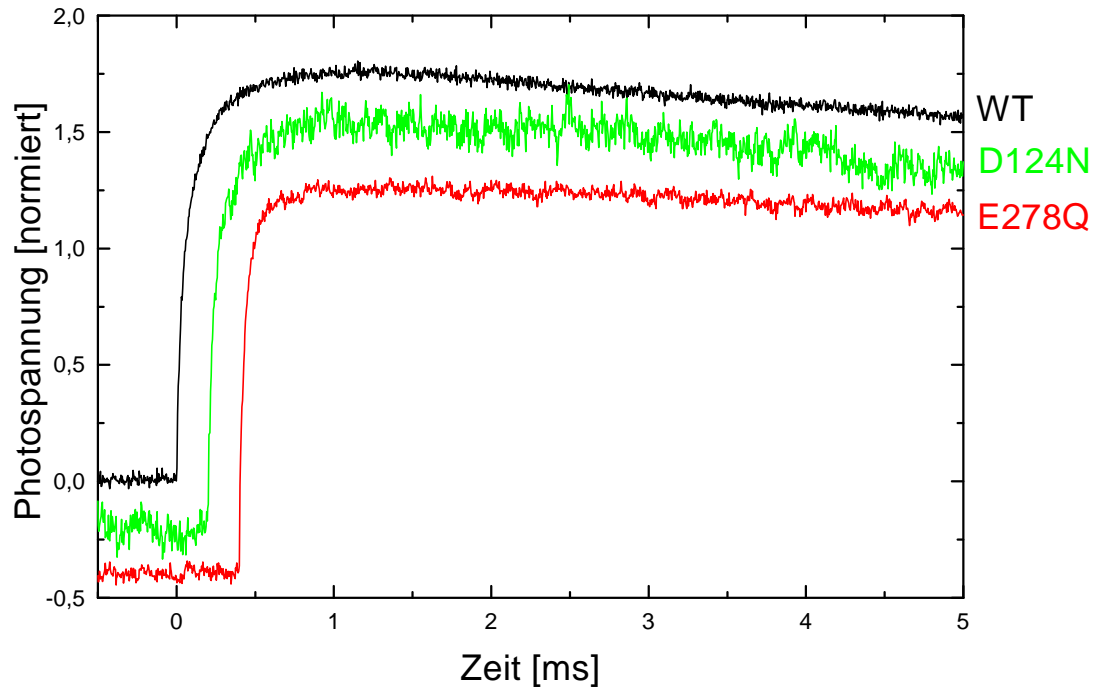


Abb. 3.7. Einfluß der D124N- bzw. E278Q-Mutation auf Vorgänge während des $O \rightarrow E$ Übergangs.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven auf die Amplitude der 20 μ s-Phase normiert. Zusätzlich wurden die Signale von D124N (grün) und E278Q (rot) um (-0.2 a.u., 0.2 ms) bzw. (-0.4 a.u., 0.4 ms) verschoben. Standardbedingungen und -puffer + 200 μ M Ferricyanid.

Abb. 3.7. vergleicht die Spannungsmessungen an WT-COV mit denen der beiden eben genannten D-Weg-Mutanten. Beide Mutanten zeigen dieselben Zeitkonstanten τ und relativen Amplituden α wie das WT-Enzym. Diese Veränderungen im Protein scheinen also keinen Einfluß auf Vorgänge während des $O \rightarrow E$ Übergangs zu haben und der D-Weg wird somit wahrscheinlich nicht für den Transfer eines Protons in Verbindung mit der Aufnahme des 1. Elektrons verwendet.

Tabelle 3.2. faßt die erhaltenen Ergebnisse noch einmal zusammen.

Reaktion	WT		D124N		E278Q	
	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.
$O \rightarrow E$	$\tau_1=21,7\pm5,5\mu\text{s}$	$0,57\pm0,10$	$\tau_1=19,7\pm2,9\mu\text{s}$	$0,58\pm0,08$	$\tau_1=22,7\pm6,1\mu\text{s}$	$0,62\pm0,11$
	$\tau_2=176\pm50\mu\text{s}$	$0,43\pm0,10$	$\tau_2=163\pm32\mu\text{s}$	$0,42\pm0,08$	$\tau_2=139\pm29\mu\text{s}$	$0,38\pm0,11$
+ KCN	$\tau_1=20,9\pm5,0\mu\text{s}$	1	$\tau_1=21,0\pm4,9\mu\text{s}$	1	$\tau_1=19,6\pm5,2\mu\text{s}$	1

Tab. 3.2. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $O \rightarrow E$ Übergang bei D-Weg-Mutanten.

3.1.6.2. K-Weg-Mutanten

Lys-354 besitzt eine Schlüsselfunktion im K-Weg. Austausch dieses Lysins gegen Methionin hat gravierende Konsequenzen für die Aufnahme von Protonen über diesen Pfad (Hosler et al., 1996; Jünemann et al., 1997; Ädelroth et al., 1998). Abb. 3.8. vergleicht die Ergebnisse der elektrischen Messungen an dieser Mutante bzw. einer Doppelmutante, bei der sowohl der K- als auch der D-Weg blockiert sind, mit denen vom WT-Enzym.

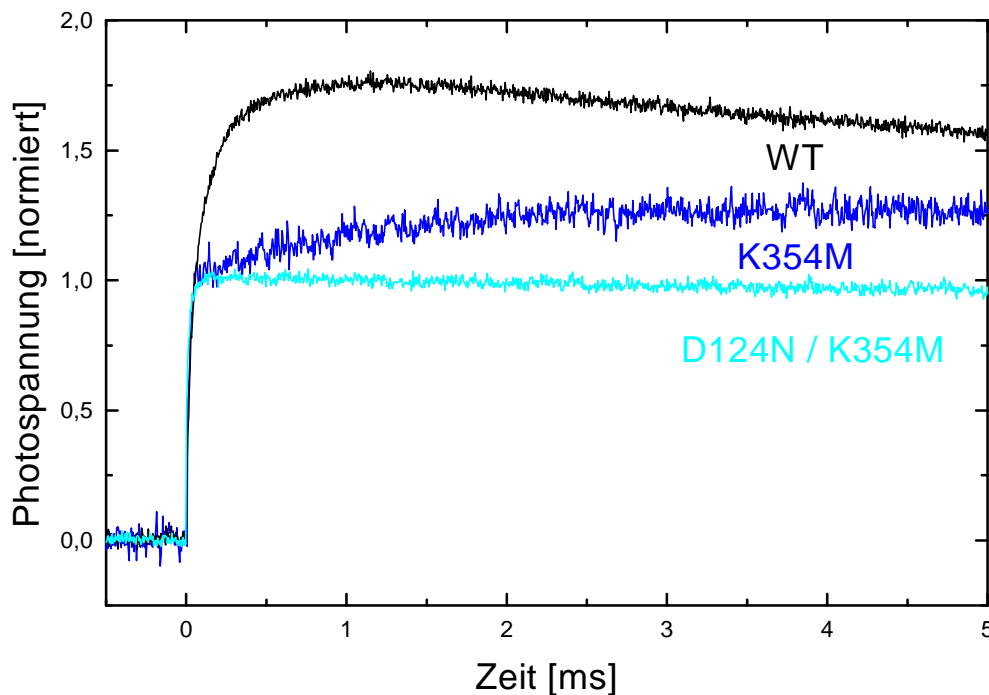


Abb. 3.8. Einfluß der K354M- und D124N/K354M-Mutationen auf Vorgänge während des $O \rightarrow E$ Übergangs.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven auf die Amplitude der 20 μ s-Phase normiert. Standardbedingungen und –puffer + 200 μ M Ferricyanid.

Im Falle von K354M können ebenfalls 2 Phasen beobachtet werden. Während im Vergleich zum WT-Enzym die schnelle Phase nicht beeinflußt wird, ist die zweite Phase dagegen 5-6-fach verlangsamt ($\tau_2 \approx 900 \mu$ s). Auch die relative Amplitude ist beeinflußt und mit $\alpha_2 \approx 0.21$ deutlich kleiner als bei WT-COX ($\alpha_2 \approx 0.43$). In der D124N/K354M-Doppelmutante ist die langsame Phase sogar vollständig verschwunden. Diese Ergebnisse legen Nahe, daß während des $O \rightarrow E$ Übergangs ein Proton aufgenommen wird und daß dies im WT-Enzym über den K-Weg geschieht. Bei blockiertem K-Weg (K354M) erfolgt die Protonenaufnahme langsamer und vermutlich alternativ über den D-Weg, da in der Doppelmutante kein Protonentransport beobachtet werden kann.

Tabelle 3.3. faßt die erhaltenen Ergebnisse noch einmal zusammen.

Reaktion	WT		K354M		D124NK354M	
	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.
$O \rightarrow E$	$\tau_1=21,7\pm5,5\mu s$	$0,57\pm0,10$	$\tau_1=18,0\pm3,8\mu s$	$0,79\pm0,08$	$\tau_1=16,4\pm1,6\mu s$	1
	$\tau_2=176\pm50\mu s$	$0,43\pm0,10$	$\tau_2=859\pm170\mu s$	$0,21\pm0,08$	---	---
+ KCN	$\tau_1=20,9\pm5,0\mu s$	1	$\tau_1=18,7\pm5,4\mu s$	1	n.b.	

Tab. 3.3. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $O \rightarrow E$ Übergang bei K-Weg-Mutanten.

Deutliche Unterschiede zum WT sind rot hervorgehoben.

3.1.7. Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen

Um zu überprüfen, ob Rubpy unter den am Bilayer verwendeten Bedingungen ein Elektron an COX übertragen kann und wie schnell dies vonstatten geht, ist es sinnvoll, zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Die vorhandene Blitzlicht-Photolyse-Aparatur (Eigenbau) mußte hierzu mit einem Dauerstrichlaser als Lichtquelle modifiziert werden (siehe Kapitel 2.3.), um ein ausreichendes Signal/Rausch Verhältnis zu erhalten.

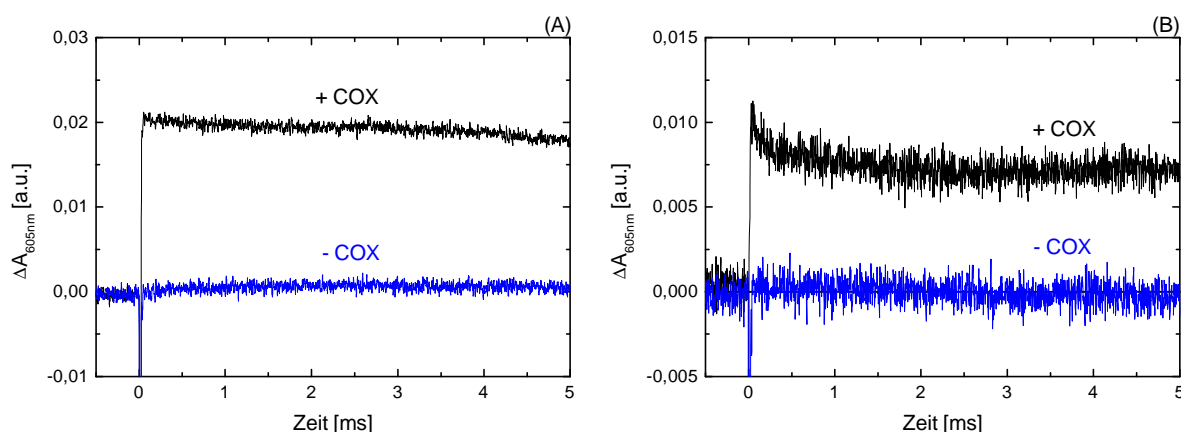


Abb. 3.9. Absorptionsänderungen bei 605 nm während des $O \rightarrow E$ Übergangs.

50 mM Hepes/KOH pH 7.4, 0.05% LM, 80 μM Rubpy, 300 μM EDTA, 300 μM Ferricyanid, 150 mM β -D-Glucose, 40 $\mu g/ml$ Glucose-Oxidase, 25 $\mu g/ml$ Katalase wurden in einer verschließbaren Halbmikro-Quarzküvette entgast und mit Argon überschichtet.

(A) blaues Signal: ohne COX; schwarzes Signal: + 20 μM COX

(B) wie (A) nach etwa zweihundert Laserblitzen

Es wurden jeweils 32 Blitze (1 Hz) gemittelt.

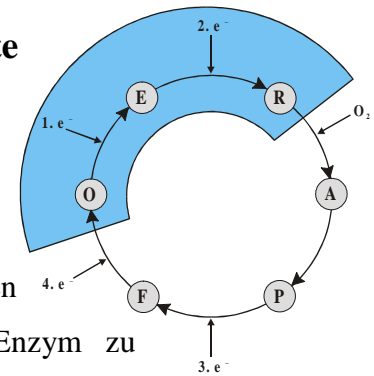
Problematisch hierbei war, daß der verwendete Laser Lichtstärkefluktuationen besitzt, die auch durch Subtraktion eines auskoppelten Referenzstrahls nicht vollständig ausgeglichen werden konnten.

Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 605 nm, die charakteristisch für reduziertes Häm *a* ist (siehe Kapitel 3.1.1.). Eine Zunahme des Signals bedeutet also Reduktion von Häm *a*. Abb. 3.9. zeigt die Absorptionsänderungen bei dieser Wellenlänge nach Anregung des Ruthenium-Komplexes durch einen 450 nm Laserblitz. In Abwesenheit von COX (blaue Kurven) ist nur ein schnelles Artefakt zu beobachten, das von der Lumineszenz des Rubpy herrührt (Nilsson, 1992). In Gegenwart von COX blieb die Absorption nach den ersten Blitzen nach einem schnellen Anstieg im beobachteten Zeitfenster (5 ms) nahezu konstant (schwarzes Signal, Abb. 3.9. (A)). Die Zeitkonstante des Anstiegs konnte aufgrund der Lumineszenz des Rubpy und den oben beschriebenen Laserlichtfluktuationen nicht genau bestimmt werden, ist aber kleiner oder gleich 30 μ s.

Nach mehreren Laserblitzen konnte nach dem anfänglichen schnellen Anstieg ein teilweiser Abfall der Absorption bei 605 nm mit einer Zeitkonstanten von etwa 200 μ s beobachtet werden (schwarzes Signal, Abb. 3.9. (B)). Dies deutet auf eine Reoxidation des Häm *a* hin, die aber vermutlich erst dann stattfindet, wenn die Oxidase ein 2. Elektron erhalten hat (näheres siehe Diskussion in Kapitel 4.2.3.).

3.2. Der O → R Übergang; Mehrfach-Blitz Experimente

In Kapitel 3.1. wurden die Vorgänge während des O → E Übergangs näher untersucht. Hier soll nun überprüft werden, welche elektrogenen Prozesse an die Aufnahme des 2. Elektrons gekoppelt sind. Ein Ansatz besteht darin, wieder vom vollständig oxidierten Zustand auszugehen, aber diesmal zwei Elektronen in das Enzym zu injizieren.



Da aber Rubpy einen Einelektronendonator darstellt, müssen die Elektronen nacheinander auf die COX übertragen werden. Erschwerend kommt hierbei hinzu, daß der Rutheniumkomplex pro Lichtblitz nur auf einen Bruchteil der Oxidase-Moleküle ein Elektron überträgt und nicht auf alle. Belichtet man Rubpy beispielsweise mit 532 nm und einer Energie von ca. 200 mJ 9 ns lang, so werden im Schnitt etwa 0.03 Elektronen auf COX übertragen (Nilsson, 1992). Man muß also mehrmals blitzen, um einen signifikanten Anteil zweifach reduzierten Proteins zu erhalten. Gleichzeitig muß aber anaerob gearbeitet werden, um bei Drei- oder Vierelektronenreduktion ein Durchlaufen des gesamten Zyklus zu verhindern.

Experimentell geht man so vor, daß die Proteoliposomen zunächst mit 200 µM Ferricyanid behandelt werden, um das Enzym vollständig in den oxidierten Zustand zu überführen. Anschließend entfernt man das Ferricyanid wieder mittels Gelfiltration. Werden nun die an die BLM adsorbierten COV mehrmals unter anaeroben Bedingungen im Abstand von 1 s belichtet, so erscheint eine zusätzliche 3. Phase mit einer Zeitkonstanten $\tau_3 \approx 1$ ms im elektrischen Signal (Abb. 3.10.). Die relative Amplitude dieser Phase steigt mit zunehmender Blitzanzahl. Da aber mit steigender Zahl an Lichtblitzen auch die Wahrscheinlichkeit steigt, daß das Enzym ein zweites Elektron erhält, scheint diese Phase mit Vorgängen, die an die Aufnahme des 2. Elektrons gekoppelt sind, verknüpft zu sein.

Erstaunlich dagegen ist, daß nach mehreren Laserblitzen die Gesamt-Amplitude abnimmt und nach einer Reihe von Lichtpulsen sich sogar das Vorzeichen des Signals ändert (Abb. 3.10.). Die Abnahme ließe sich damit erklären, daß nach einer großen Zahl an Blitzen Populationen von zwei-, drei- und vierelektronenreduzierter Oxidase entstanden sind, da das Enzym 4 Redoxzentren besitzt, die reduziert werden können. Die Aufnahme des 4. Elektrons ist aber nicht elektrogen, da hierbei das Elektron auf Cu_A bleibt und nicht das Dielektrikum durchwandert. Dies führt zu einer Abnahme des Signals. Auch nach Injektion des 3. Elektrons verbleibt das Elektron wahrscheinlich partiell auf Cu_A und verkleinert somit die Signalgröße.

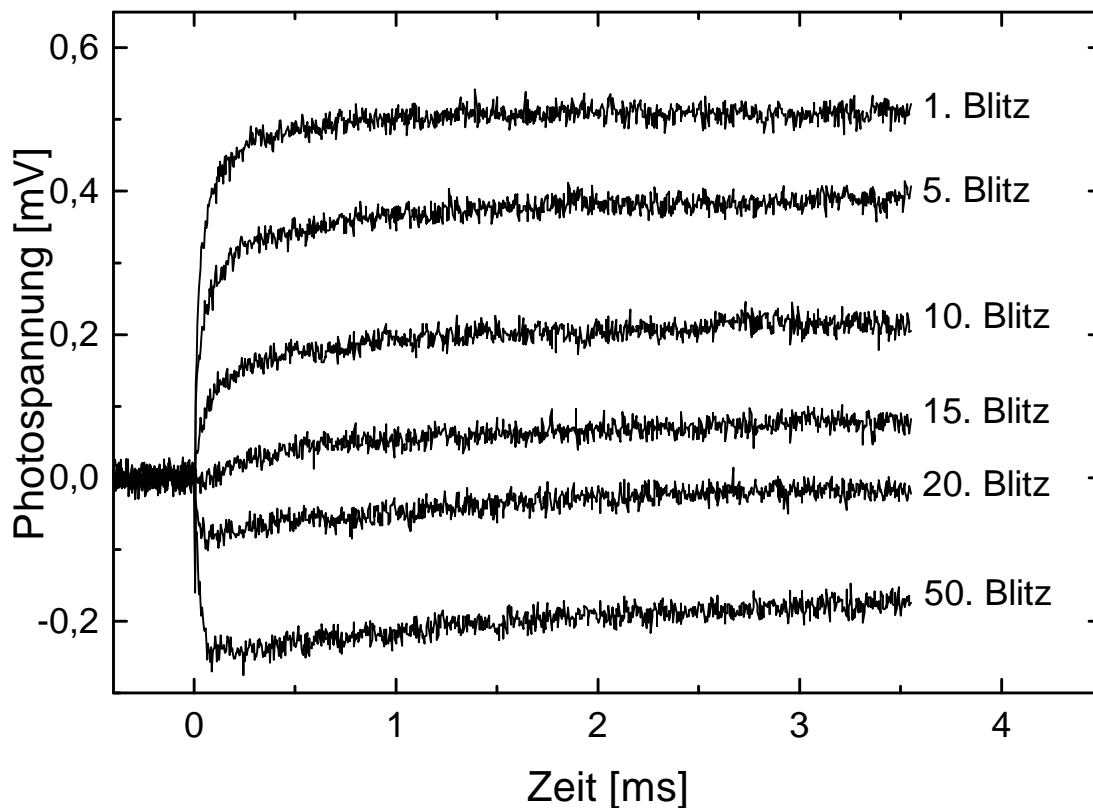


Abb. 3.10. Mehrfach-Blitz Experimente am WT-Enzym unter anaeroben Bedingungen.

COV wurden in Gegenwart von Rubpy mehreren Laserblitzen mit einer Frequenz von 1Hz ausgesetzt. Die elektrogenen Antworten nach dem ersten bzw. nachfolgenden Laserpulsen sind gezeigt. Standardbedingungen und -puffer.

Hinzu kommt, daß der angeregte Rutheniumkomplex nicht nur reduzierende Eigenschaften und die Fähigkeit besitzt, ein Elektron auf ein oxidiertes Protein zu übertragen [$E(\text{Ru(III)bpy/Ru(II)*bpy}) = -0.86 \text{ V}$], er kann genauso gut ein reduziertes Protein oxidieren [$E(\text{Ru(II)*bpy/Ru(I)bpy}) = 0.84 \text{ V}$] (Roundhill, 1994).

In drei- und vierelektronenreduzierter COX liegt das Cu_A -Zentrum teilweise bzw. vollständig reduziert vor. Aus diesem Grund kann der angeregte Rutheniumkomplex ein Elektron von Cu_A aufnehmen. Dies führt vermutlich zu einem Rückfluß von Elektronen von Häm a und dem binuklearen Zentrum zu Cu_A und zwar mit sehr ähnlichen kinetischen Eigenschaften wie während der Reduktion ($\tau = 20 - 25 \text{ }\mu\text{s}$), nur mit umgekehrtem Vorzeichen. Zusätzlich ist das gebildete Ru(I)bpy wahrscheinlich in der Lage, im Dunkeln wieder ein Elektron an die COX abzugeben [$E(\text{Ru(II)bpy/Ru(I)bpy}) = -1.28 \text{ V}$] (Roundhill, 1994). Diese Besonderheiten des Rubpy würden die Signalabnahme und das nach vielen Blitzen beobachtete negative Signal erklären.

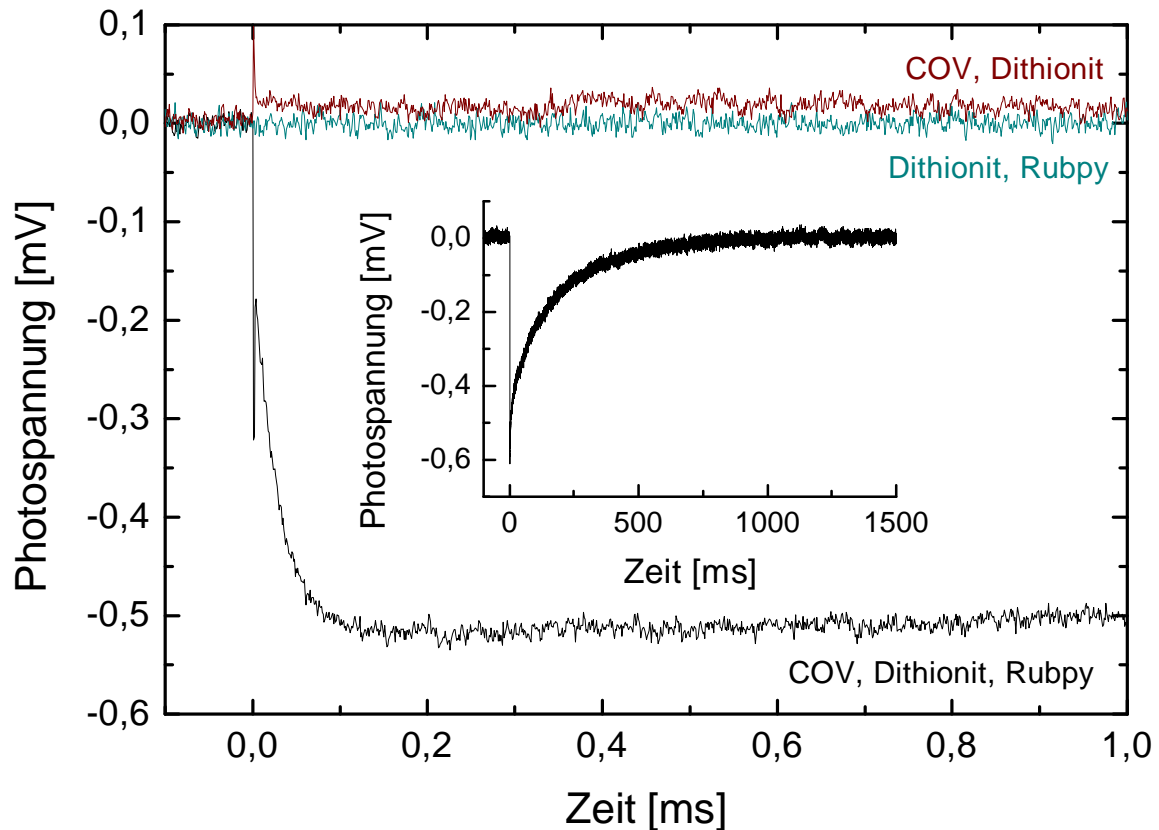


Abb. 3.11. Potentialänderung Dithionit-reduzierter COV nach Lichtanregung in Gegenwart von Rubpy.

Die farbig dargestellten Meßkurven sind das Ergebnis von Kontrollexperimenten, bei denen mit Dithionit reduzierte Proteoliposomen in Abwesenheit von Rubpy (braun) bzw. Dithionit und Rubpy ohne COV (türkis) belichtet wurden. Eingefügtes Bild: Relaxation des Signals mit der Systemzeit. Puffer: 50 mM Hepes/KOH pH 7,4, 2 mM Dithionit.

Daß der angeregte Rutheniumkomplex tatsächlich in der Lage ist, Elektronen von reduzierter COX aufzunehmen, zeigt die in Abb. 3.11. dargestellte Meßkurve. An die BLM angelagerte Proteoliposomen werden mit 2 mM Dithionit behandelt und somit vollständig reduziert. In Gegenwart von Rubpy erhält man nach einem Laserpuls zum Zeitpunkt Null zunächst das schon beschriebene Ruthenium-Artefakt (schwarze Kurve), anschließend fällt das Signal mit einer Zeitkonstanten $\tau = 20 - 25 \mu\text{s}$ ab und relaxiert schließlich wieder mit der Systemzeit ($\tau_0 \approx 250 \text{ ms}$; eingefügtes Bild in Abb. 3.11.).

Das beobachtete Signal ist nicht das Ergebnis lichtinduzierter struktureller Änderungen in COX, da in Abwesenheit von Rubpy ein anderes, sehr kleines, positives Signal beobachtet werden kann (dargestellt in braun in Abb. 3.11.), das vergleichbar mit der Potentialänderung nach Belichtung des vollständig oxidierten Enzyms ist (siehe Abb. 3.2. (C)).

Bei der Meßkurve handelt es sich auch nicht um ein Rubpy/Dithionit-Artefakt, da diese beiden Substanzen nach Belichtung an der BLM kein Signal zeigen (dargestellt in türkis in Abb. 3.11.).

Der angeregte Rutheniumkomplex kann also ein Elektron von der reduzierten Oxidase aufnehmen und man beobachtet dasselbe elektrische Signal wie nach mehreren aufeinanderfolgenden Blitzen, ausgehend vom O-Zustand (Abb. 3.10.). In beiden Fällen handelt es sich bei den Signalen mit negativer Amplitude und der Zeitkonstanten $\tau \approx 20 - 25 \mu\text{s}$ somit vermutlich um den Elektronenrückfluß von Häm *a* zum Cu_A.

3.2.1. Einfluß von D₂O auf die Kinetik des O → R Übergangs

Führt man das eben beschriebene Mehrfach-Blitz Experiment in schwerem Wasser durch, so erhält man ein Signal, dessen Anstieg sich ebenfalls mit 3 Exponentialfunktionen beschreiben läßt. Während die Zeitkonstante τ_1 der schnellen Phase unbeeinflusst bleibt, verlangsamen sich die beiden anderen Zeiten τ_2 und τ_3 um den Faktor 2 und zeigen somit einen kinetischen Deuterium-Isotopeneffekt. Dies deutet darauf hin, daß die beiden langsamen Phasen eventuell mit Protonentransfer-Schritten verknüpft sind. Sie sind an Vorgänge am katalytischen Zentrum gekoppelt, da beide komplett durch Cyanid inhibiert werden können.

Die erhaltenen Zeitkonstanten sind in Tabelle 3.4. noch einmal zusammengefaßt. Es sind keine relativen Amplituden angegeben, da man bei Mehrfach-Blitz Experimenten stets Gemische verschiedener Zustände bekommt und eine quantitative Interpretation der Daten erheblich erschwert, wenn nicht gar unmöglich wird.

Reaktion	WT, H ₂ O	WT, D ₂ O
O → R	$\tau_1 = 19,6 \pm 3,3 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 21,8 \pm 5,1 \mu\text{s}$
	$\tau_2 = 154 \pm 45 \mu\text{s}$	$\tau_2 = 304 \pm 75 \mu\text{s}$
	$\tau_3 = 1,1 \pm 0,3 \text{ ms}$	$\tau_3 = 2,0 \pm 0,6 \text{ ms}$
+ KCN	$\tau_1 = 20,9 \pm 5,0 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 20,2 \pm 4,7 \mu\text{s}$

Tab. 3.4. Zeitkonstanten für den O → R Übergang in H₂O und D₂O.

Deutliche Unterschiede zum WT, H₂O sind rot hervorgehoben.

3.2.2. Einfluß von Punktmutationen auf Vorgänge während des $O \rightarrow R$ Übergangs

Abb. 3.12. vergleicht die elektrischen Signale nach dem 1. Laserblitz ($O \rightarrow E$; schwarze Kurven) mit denen nach dem 5. Lichtpuls ($O \rightarrow R$; farbige Kurven). Die Ergebnisse von WT, K- und D-Weg-Mutanten sind dargestellt.

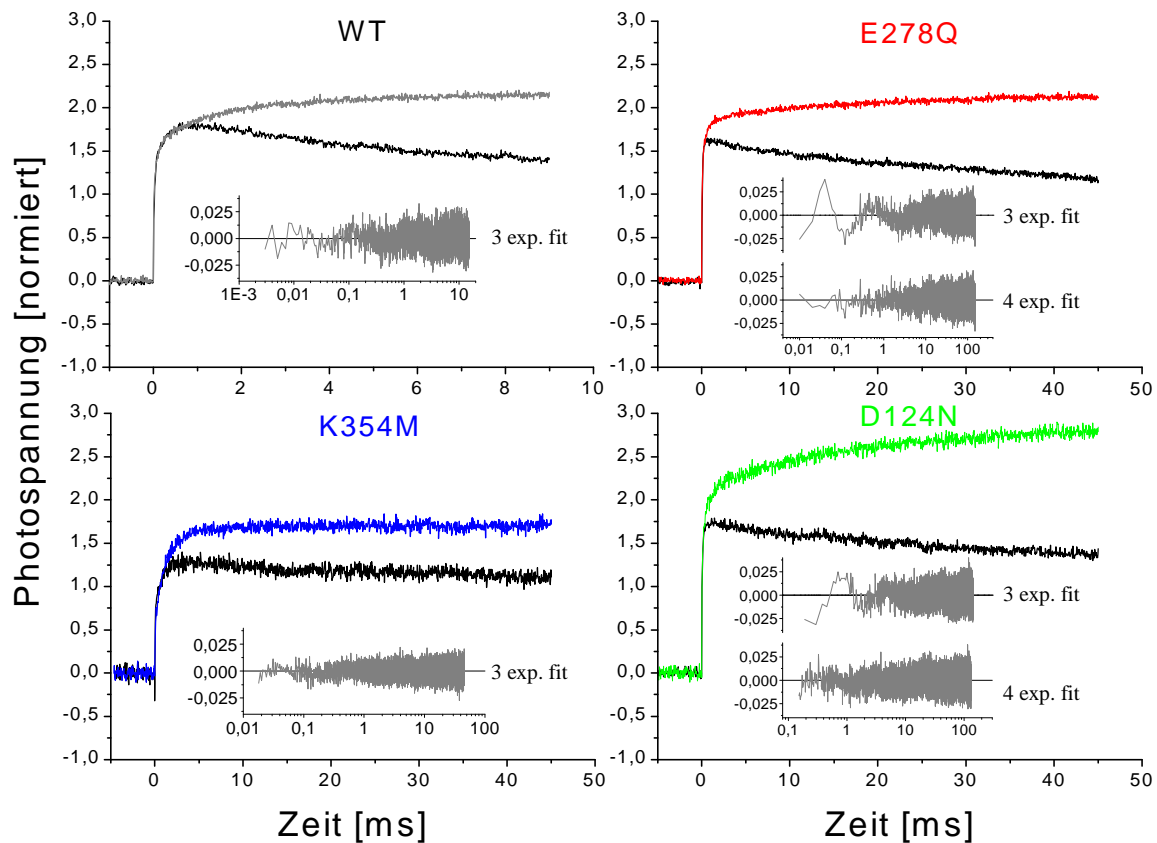


Abb. 3.12. Auswirkung von Punktmutationen auf Spannungsänderungen während des $O \rightarrow R$ Übergangs.

In jedem Bild wird das photoelektrische Signal nach dem 5. Laserblitz ($O \rightarrow R$; farbige) dem nach dem 1. Laserblitz ($O \rightarrow E$; schwarz) gegenübergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Kurven auf die 20 μ s-Phase normiert. Die eingefügten Bilder zeigen die Abweichung der Fitkurven vom Signal. Standardbedingungen und -puffer.

In allen vier Fällen bleiben auch nach dem 5. Blitz die ersten beiden Zeitkonstanten τ_1 und τ_2 gleich, aber zusätzliche langsame Phasen treten auf. Beim WT-Enzym erhält man eine dritte Phase mit $\tau_3 \approx 1$ ms, bei der K354M-Mutante eine mit $\tau_3 \approx 4.3$ ms. Die Signale der D-Weg-Mutanten D124N und E278Q lassen sich nicht zufriedenstellend mit 3 Exponentialfunktionen anpassen, und der beste Fit liefert 4 Phasen (siehe eingefügte Bilder in Abb. 3.12. und Tab. 3.5.) mit zusätzlichen Zeitkonstanten von $\tau_3 \approx 2$ ms und $\tau_4 \approx 15$ ms in beiden Fällen.

Zugabe von Ferricyanid zum WT und den Mutanten-Enzymen führt zum Verschwinden der langsamen Phasen τ_3 sowie τ_4 und bestätigt, daß diese auf die Reduktion des Einelektronenreduzierten Zustandes E zurückzuführen sind. KCN inhibiert bis auf den schnellen Prozeß alle Phasen vollständig, was darauf schließen läßt, daß die langsamen Phasen an Vorgänge am binuklearen Zentrum gekoppelt sind.

Tabelle 3.5. faßt die bei diesen Experimenten erhaltenen Zeitkonstanten nochmals zusammen.

Reaktion	WT	K354M	D124N	E278Q
O → R	$\tau_1 = 19,6 \pm 3,3 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 31,9 \pm 5,6 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 28,7 \pm 6,5 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 28,8 \pm 5,3 \mu\text{s}$
	$\tau_2 = 154 \pm 45 \mu\text{s}$	$\tau_2 = 897 \pm 181 \mu\text{s}$	$\tau_2 = 170 \pm 53 \mu\text{s}$	$\tau_2 = 168 \pm 36 \mu\text{s}$
	$\tau_3 = 1,1 \pm 0,3 \text{ ms}$	$\tau_3 = 4,3 \pm 0,7 \text{ ms}$	$\tau_3 = 2,1 \pm 0,5 \text{ ms}$	$\tau_3 = 1,5 \pm 0,6 \text{ ms}$
			$\tau_4 = 17,6 \pm 5,4 \text{ ms}$	$\tau_4 = 14,9 \pm 5,9 \text{ ms}$
+ KCN	$\tau_1 = 20,9 \pm 5,0 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 18,7 \pm 5,4 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 21,0 \pm 4,9 \mu\text{s}$	$\tau_1 = 19,6 \pm 5,2 \mu\text{s}$

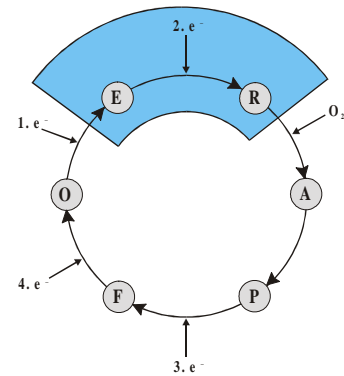
Tab. 3.5. Zeitkonstanten für den O → R Übergang bei K- und D-Weg-Mutanten.

Deutliche Unterschiede zum WT sind rot hervorgehoben.

Die Ergebnisse mit den Mutanten legen nahe, daß sowohl K- als auch D-Weg während des E→R Übergangs in irgendeiner Form beteiligt sind. Um aber genauere und auch quantitative Aussagen machen zu können, ist es wichtig, Einelektronen-Reduktionsexperimente ausgehend von einem definierten E-Zustand durchzuführen (siehe Kapitel 3.3.).

3.3. Der E → R Übergang

1998 reanalytierte Michel bis dato publizierte Daten (Michel, 1998) und schlug vor, daß ein Proton bereits während des E → R Übergangs gepumpt wird. Um diese Behauptung zu überprüfen, ist es, wie bereits in Kapitel 3.2. beschrieben, wichtig, von einem definierten E-Zustand auszugehen.



Das Einstellen des E-Zustandes ist schwierig und in der Literatur bisher kaum beschrieben. Es wurde hier ein Ansatz gewählt, bei dem die Oxidase zunächst durch H_2O_2 in den F-Zustand überführt (siehe Kapitel 3.6) und schließlich durch den Zweielektronendonor Kohlenmonoxid der E-Zustand gebildet wird (Witt und Chan, 1987). Arbeitet man unter anaeroben Bedingungen und injiziert in den so gewonnenen E-Zustand ein Elektron, so kann das gebildete zweielektronenreduzierte Enzym CO binden und der MV-CO Zustand sollte entstehen. Aus diesem Grund soll hier nun zunächst einmal näher auf die elektrischen Eigenschaften der MV-CO COX eingegangen werden.

3.3.1. Der MV-CO Zustand

Beim MV-CO Enzym, handelt es sich um einen artifiziellen Zustand der Oxidase, der schon früh beschrieben wurde (Greenwood et al., 1974). Häm a_3 und Cu_B liegen hierbei reduziert vor, Häm a und Cu_A oxidiert. CO ist am Häm a_3 gebunden und hält die Elektronen im katalytischen Zentrum fest.

3.3.1.1. Einstellen des MV-CO Zustandes

Der MV-CO Zustand kann ausgehend vom vollständig oxidierten Zustand durch mehrstündige Inkubation unter CO-Atmosphäre bei Ausschluß von Sauerstoff in 100%iger Ausbeute erhalten werden. Die Geschwindigkeit, mit der diese Form des Enzyms gebildet wird, hängt von der Proteinkonzentration, dem CO-Partialdruck, der Temperatur und dem pH-Wert ab und beträgt unter den gewählten Bedingungen (Standardpuffer, pH 7.4) etwa 4 Stunden.

Die Bildung erfolgt gemäß folgender Gleichungen (Brzezinski und Malmström, 1985):

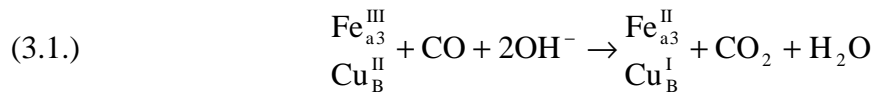


Abb. 3.13. zeigt das Absorptionsspektrum des MV-CO Enzyms (eingefügtes Bild), sowie das Differenzspektrum MV-CO minus O-Zustand. Der Peak bei 430 nm im Absolutspektrum ist typisch für Häm $a_3^{2+} - \text{CO}$, die fehlende Bande bei 605 nm weist auf oxidiertes Häm a hin. Im Differenzspektrum findet man ein Minimum bei 414 nm und charakteristische Banden bei 434 nm, etwa 550 nm und 592 nm.

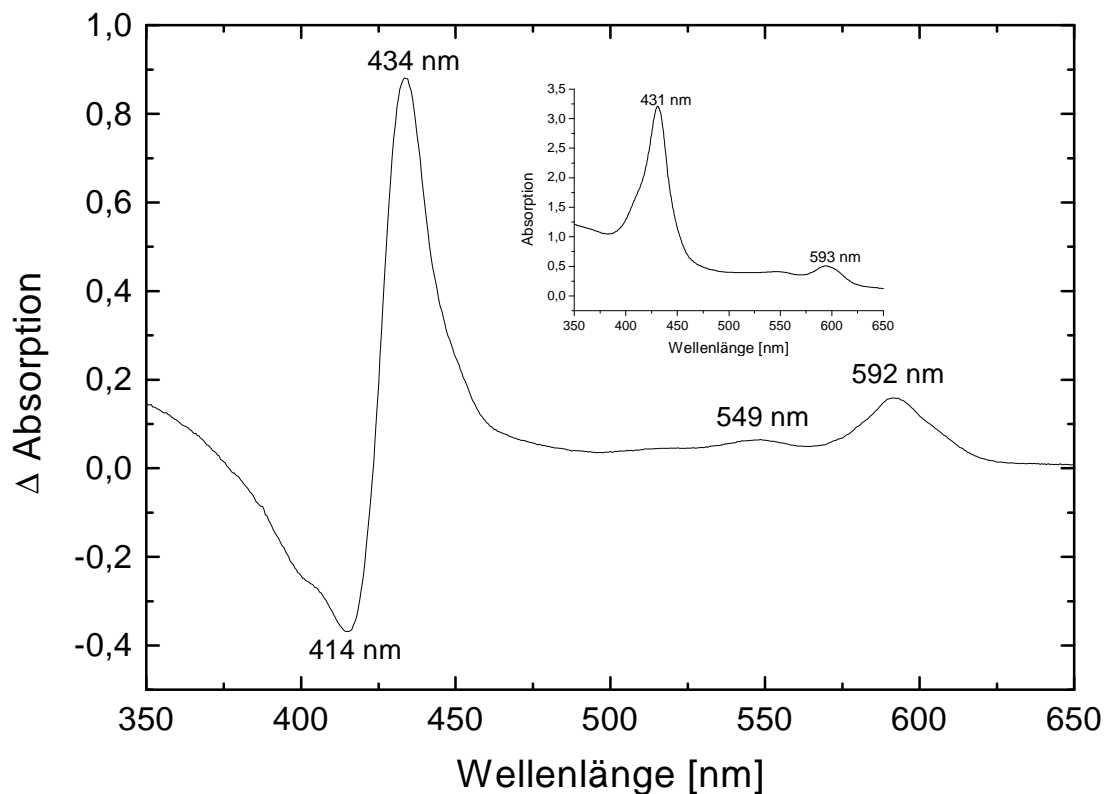


Abb. 3.13. Spektrale Änderungen bei der Reaktion oxidierter COV mit CO unter anaeroben Bedingungen.

Das Differenzspektrum (MV-CO minus oxidiert) und das Absolutspektrum (eingefügtes Bild) sind gezeigt. Herstellung: 4 stündige Inkubation einer 20 μM COV-WT-Suspension (Standardpuffer) unter CO-Atmosphäre.

3.3.1.2. Spannungsmessungen am MV-CO Enzym

In diesem Kapitel soll die Kinetik des Elektronenrückflusses nach CO-Photolyse in Abwesenheit von Sauerstoff mit Hilfe von Spannungsmessungen genauer untersucht werden. Obwohl das MV-CO Enzym bereits bei elektrischen Messungen zur Kalibrierung transportierter Ladungen verwendet wurde (Jasaitis et al., 1999), sind bisher keine detaillierten elektrischen Messungen dieser Reaktion veröffentlicht worden.

Abb. 3.14. stellt die Ergebnisse der elektrischen Messungen am MV-CO Zustand in H_2O und D_2O gegenüber.

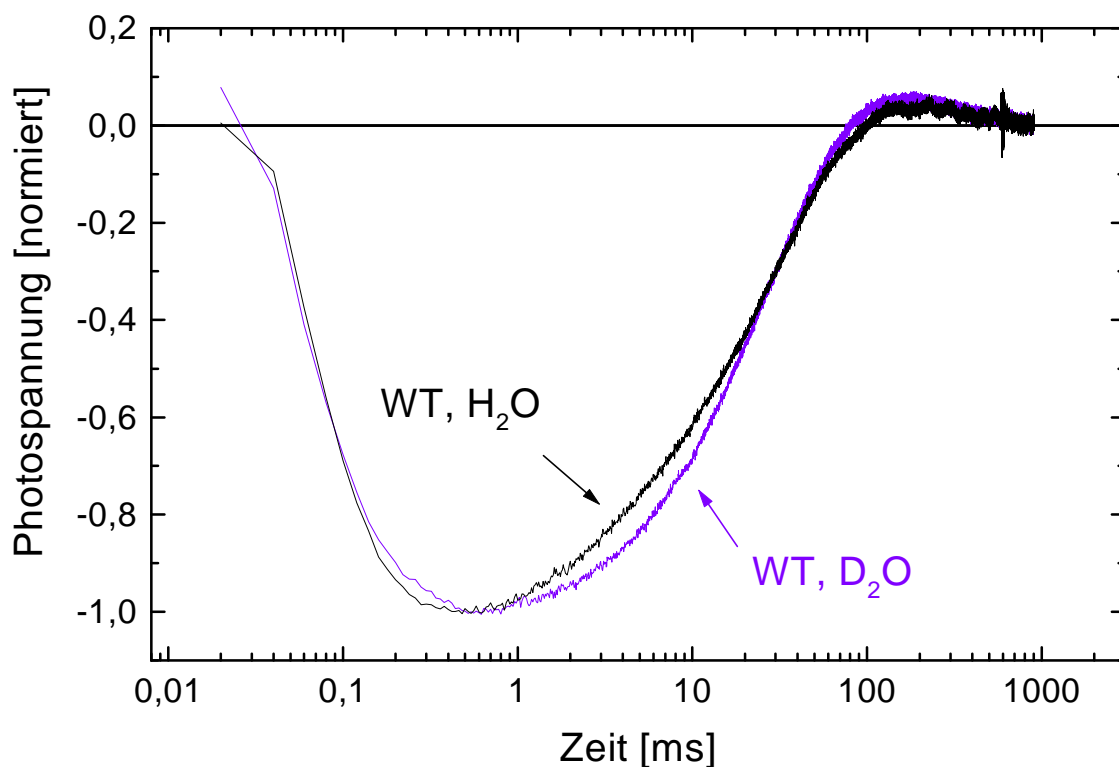


Abb. 3.14. Vergleich von Spannungsmessungen in H_2O und D_2O .

CO-Photolyse Experiment am MV-CO Enzym in Abwesenheit von Sauerstoff in Wasser (schwarze Kurve) bzw. schwerem Wasser (violette Kurve). Zur besseren Vergleichbarkeit sind die beiden Signale auf die Größe der negativen Potentialänderung normiert. Standardbedingungen und –puffer, aber CO-Atmosphäre statt Argon.

Die erhaltenen Signale lassen sich jeweils mit einer Summe aus 5 Exponentialfunktionen anpassen, wobei in Abwesenheit von Rubpy zwei Zeitkonstanten den schnellen Abfall des Signals beschreiben, zwei weitere den Anstieg und eine letzte die Relaxation auf den Wert Null.

Die gesamten Parameter sind in Tabelle 3.6. zusammengefaßt.

MV-CO, H ₂ O		MV-CO, D ₂ O	
$\tau_1 = 27,4 \pm 5,8 \mu\text{s} \downarrow$	$\alpha_1 = -0,74 \pm 0,05$	$\tau_1 = 35,7 \pm 4,7 \mu\text{s} \downarrow$	$\alpha_1 = -0,66 \pm 0,09$
$\tau_2 = 112,7 \pm 43,5 \mu\text{s} \downarrow$	$\alpha_2 = -0,26 \pm 0,05$	$\tau_2 = 124,8 \pm 11,2 \mu\text{s} \downarrow$	$\alpha_2 = -0,34 \pm 0,09$
$\tau_3 = 2,8 \pm 1,0 \text{ ms} \uparrow$	$\alpha_3 = 0,12 \pm 0,08$	$\tau_3 = 10,9 \pm 1,4 \text{ ms} \uparrow$	$\alpha_3 = 0,14 \pm 0,04$
$\tau_4 = 30,4 \pm 4,2 \text{ ms} \uparrow$	$\alpha_4 = 1,01 \pm 0,08$	$\tau_4 = 28,7 \pm 3,3 \text{ ms} \uparrow$	$\alpha_4 = 0,96 \pm 0,04$
$\tau_5 = 400 \pm 148 \text{ ms} \downarrow$	$\alpha_5 = -0,13 \pm 0,06$	$\tau_5 = 323 \pm 42 \text{ ms} \downarrow$	$\alpha_5 = -0,10 \pm 0,06$

Tab. 3.6. Zeitkonstanten und relative Amplituden für die Elektronenrückfluß-Reaktion in H₂O und D₂O.

Deutliche Unterschiede zum WT, H₂O sind rot hervorgehoben. Die kinetischen Parameter wurden aus gemittelten Meßkurven (jeweils 16 Signale mit 1 Hz Blitzfrequenz) erhalten.

Nur eine der fünf Zeitkonstanten ändert sich in schwerem Wasser: τ_3 ist in D₂O 3-4 mal langsamer als in H₂O. Die anderen Phasen zeigen im Rahmen ihres Fehlers keine Abweichung. Die Zuordnung der einzelnen Phasen zu verschiedenen Prozessen im Protein erfolgt in Kapitel 4.3.1.

Bei den relativen Amplituden sei anzumerken, daß sich diese in Abhängigkeit der Zahl der Laserblitze ändern. So tragen beispielsweise nach nur einem Laserblitz die beiden schnellen Phasen τ_1 und τ_2 etwa gleich viel zum Abfall des Signals bei. In vielen Fällen läßt sich hierbei die Potentialabnahme mit nur einer Exponentialfunktion recht gut anpassen und man erhält eine Zeitkonstante von ca. 75 μs . Blitzt man dagegen sehr oft im Abstand von 1 Hz auf die BLM-adsorbierten Liposomen im MV-CO Zustand, so verschieben sich die Amplituden der beiden Phasen immer mehr zu Gunsten der schnelleren und man erhält schließlich ausschließlich eine Phase mit einer Zeitkonstanten von ca. 35 μs .

3.3.2. Der einelektronenreduzierte Zustand E

Der einelektronenreduzierte Zustand E ist bisher kaum untersucht worden. Die einzigen in der Literatur beschriebenen Versuche, diese Spezies einzustellen, sind Zugabe substöchiometrischer Mengen an Reduktionsmittel zum oxidierten Enzym mittels der FIRE-Technik (Moody, 1991) bzw. Reduktion des Oxoferryl-Zustandes durch den Zweielektronen-Donor CO bei tiefen Temperaturen (Witt et al., 1986; Witt und Chan, 1987).

FIRE steht für „*Flash-induced photoreduction*“. Bei dieser Methode entsteht nach einem Lichtblitz die radikalische Semichinonform von N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS), die die Oxidase direkt reduzieren kann. Dieses Verfahren ist also der Photoreduktion durch

Rubpy sehr ähnlich und eignet sich somit nicht, das Enzym vollständig in den E-Zustand zu überführen (vergleiche Kapitel 3.2.).

Die Methode mit Kohlenmonoxid dagegen erschien vielversprechend und diente hier als Ausgangspunkt zum Einstellen des E-Zustandes.

3.3.2.1. Einstellen des E-Zustandes

Behandelt man COX mit einem 10 bis 100fachen Überschuß H_2O_2 , so kann das Enzym in den Oxoferryl-Zustand F überführt werden (siehe Kapitel 3.6.). Das UV/Vis-Differenzspektrum (F minus O) besitzt ein Minimum bei 414 nm, ein Maximum bei 436 nm und eine typische breite Bande bei 580 nm (schwarzes Spektrum in Abb. 3.15. (A)). Werden anschließend Katalase und Glucose-Oxidase zugesetzt, um überschüssiges H_2O_2 sowie restlichen Sauerstoff zu entfernen, und sofort mit Kohlenmonoxid begast, so erhält man unmittelbar danach ein Differenzspektrum mit einem Minimum um 414 nm und Banden bei 443 nm, 520 nm und 608 nm (blaue und grüne Kurve in Abb. 3.15. (A)). Dies sind genau die Charakteristika des von (Moody, 1991) beschriebenen und mit Hilfe der FIRE-Technik gewonnenen Differenzspektrums E minus O.

Bei WT-Proteoliposomen, die 3 μM Enzym enthalten, ist der E-Zustand etwa 10 min stabil und geht dann in den MV-CO Zustand über, mit den in Kapitel 3.3.1.1. bereits beschriebenen Banden im Differenzspektrum bei 414 nm, 434 nm, 550 nm und 592 nm.

Mit steigender Enzymkonzentration in den Liposomen nimmt die Lebensdauer des E-Zustandes ab. Bei den 20 μM WT-Proteoliposomen in Abb. 3.15 (B) ist beispielsweise bereits nach 2 min mehr COX im MV-CO als im E-Zustand.

Auch die Beweglichkeit der Oxidase-Moleküle scheint eine Rolle zu spielen. So ist bei gleicher Proteinkonzentration die einelektronenreduzierte Spezies in Liposomen stabiler als derselbe Zustand beim solubilisierten Enzym.

Abb. 3.16. zeigt die Versuche, die Mutanten D124N und K354M in die einelektronenreduzierte Form zu überführen. Während bei D124N-COX selbst im solubilisierten Zustand nach über 2 h der überwiegende Teil des Proteins in der E-Spezies vorliegt (Abb. 3.16. (A)), findet man in 2.3 μM K354M-Proteoliposomen nach 10 min nur einen Bruchteil des Enzyms in der E-Form vor. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Größe der 609 nm Bande mit der 580 nm Bande vergleicht. Beim WT ist diese etwa 1.5 mal größer, bei K354M dagegen nur ca. $\frac{1}{4}$. der 580 nm Bande. Bei dieser K-Weg-Mutante wird also nahezu kein E-Zustand gebildet.

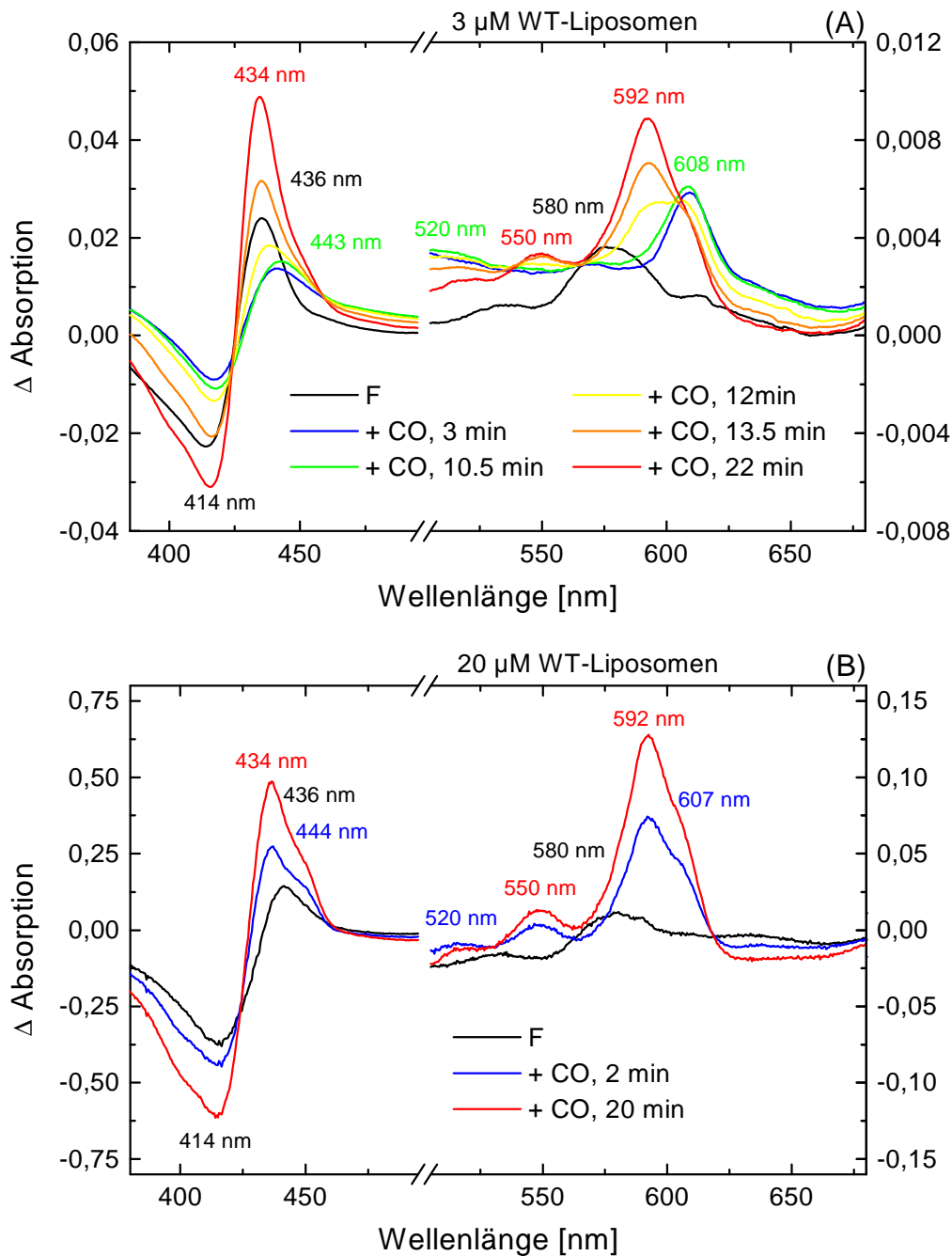


Abb. 3.15. Spektrale Änderungen bei der Reaktion von Oxoferryl-COV (WT) mit CO unter anaeroben Bedingungen.

Man beachte, daß der Wellenlängenbereich von 500 bis 680 nm im Vergleich zur Soret-Region 5fach vergrößert dargestellt ist.

- (A) 500 μ l WT-Liposomen, die 6 μ M Enzym enthalten, werden mit 500 μ l Puffer (50 mM Hepes/KOH pH 7.4, 100 mM β -D-Glucose) in einer Küvette für anaerobes Arbeiten gemischt, entgast und mit Argon überschichtet. Nach Aufnahme des Spektrums im oxidierten Zustand versetzt man mit H_2O_2 (100facher Überschuß) und 40 μ g/ml Glucose-Oxidase. Nach etwa 2 minütiger Inkubation erhält man das Spektrum vom F-Zustand. Schwarz dargestellt ist das Differenzspektrum F minus O. Anschließend wird 25 μ g/ml Katalase zugefügt, 1 min im Dunkeln mit CO begast und daraufhin alle 90 sec ein Spektrum aufgenommen.
- (B) Wie (A), nur mit 20 μ M Proteoliposomen.

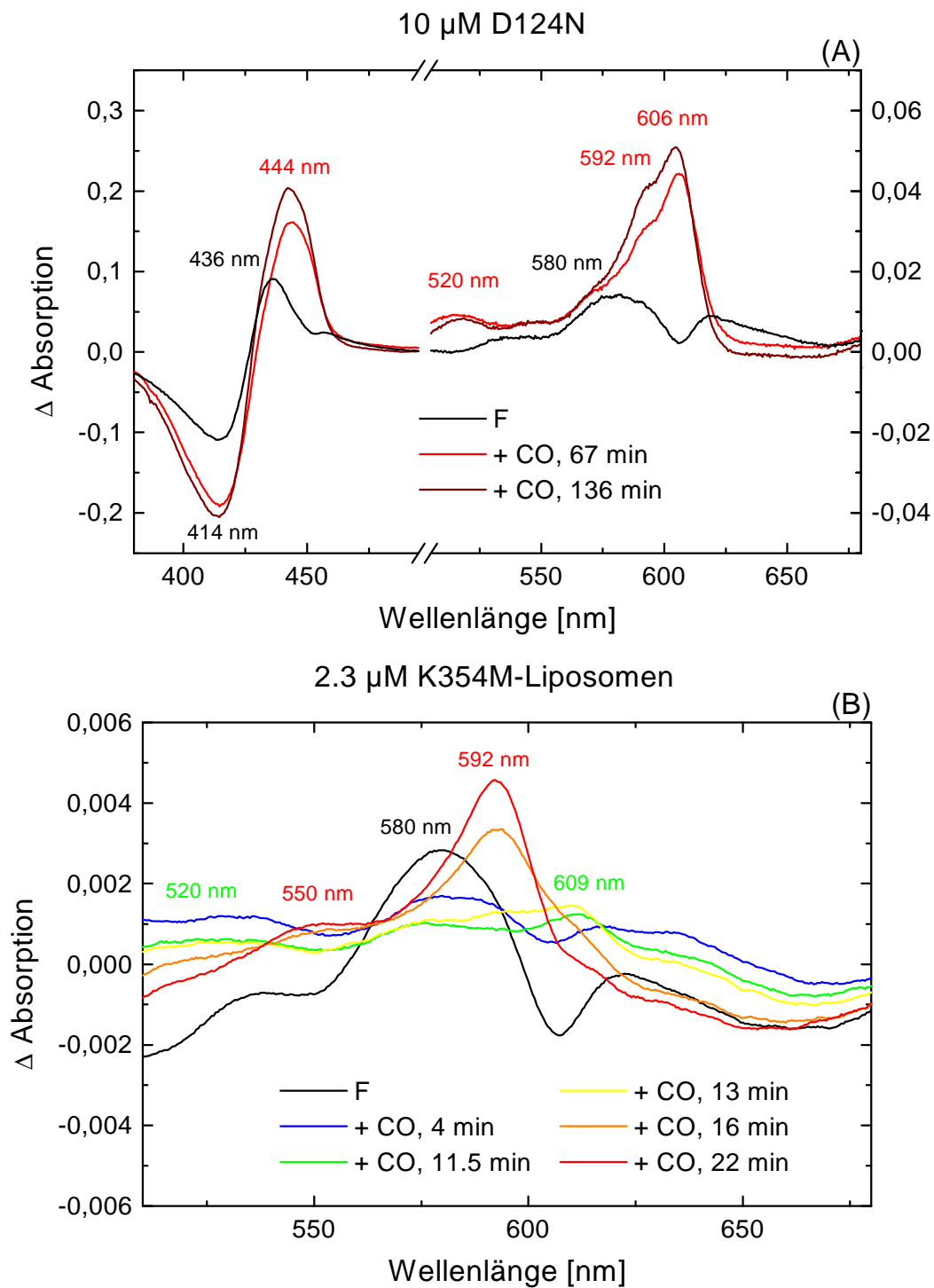


Abb. 3.16. Einfluß von Punktmutationen (D124N, K354M) auf die Bildung des E-Zustandes.

Das Einstellen des E-Zustandes erfolgt wie bei Abb. 3.15. beschrieben.

(A) 10 μ M solubilisiertes D124N-Enzym.

(B) 2.3 μ M K354M-Liposomen, 200 μ M Ferricyanid.

3.3.3. Einelektronenreduktion des E-Zustandes

3.3.3.1. Spannungsmessungen am WT-Enzym

Läßt man Proteoliposomen an die BLM anlagern und stellt dann analog Kapitel 3.3.2. den E-Zustand ein, so erhält man nach einem Laserblitz in Gegenwart von 80 μM Rubpy / 300 μM EDTA das in Abb. 3.17. in schwarz und mit $A=1$ gekennzeichnete Signal. Der Anstieg dieser Kurve läßt sich mit 3 Exponentialfunktionen beschreiben und liefert Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 27 \mu\text{s}$, $\tau_2 \approx 200 \mu\text{s}$ und $\tau_3 \approx 1.5 \text{ ms}$ mit relativen Amplituden $\alpha_1 \approx 0.26$, $\alpha_2 \approx 0.25$ und $\alpha_3 \approx 0.49$ (siehe Tab. 3.7.).

An diesem Teil des katalytischen Zyklus ($E \rightarrow R$) sind also mindestens 3 elektrogene Prozesse beteiligt. Aus den relativen Amplituden können nun auch quantitative Aussagen über die transportierten Ladungen gewonnen werden (siehe Kapitel 4.3.3.).

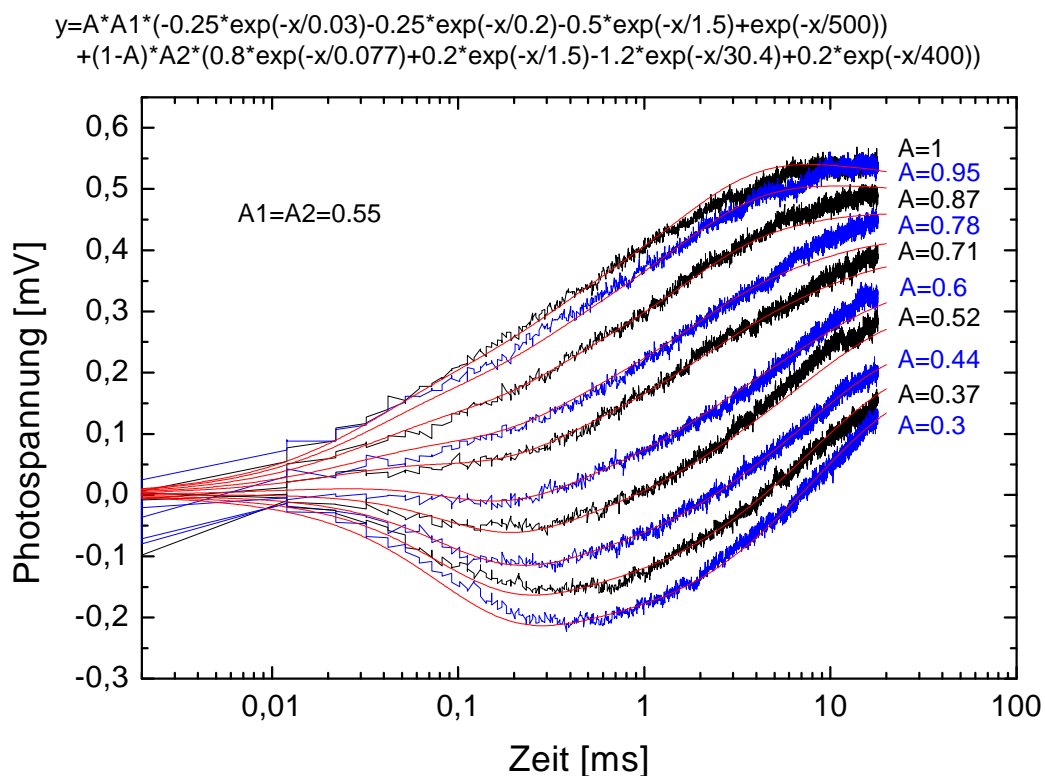


Abb. 3.17. Mehrfach-Blitz Experimente am WT-Enzym unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.

COV im E-Zustand wurden in Gegenwart von Rubpy mehreren Laserblitzen mit einer Frequenz von 1 Hz ausgesetzt. Die elektrogenen Antworten nach dem ersten bzw. nachfolgenden Laserpulsen sind gezeigt. Die Signale wurden in Abwesenheit von Sauerstoff unter CO-Atmosphäre aufgenommen. In rot sind die Anpassungskurven dargestellt, die mit Hilfe der oberhalb des Bildes angegebenen Gleichung gewonnen wurden (Erläuterungen siehe Text).

Die erhaltenen Zeitkonstanten stimmen recht gut mit den in Kapitel 3.2. für den $O \rightarrow R$ Übergang bestimmten Parametern überein. Die Tatsache, daß τ_1 und τ_2 für den $O \rightarrow E$ und den $E \rightarrow R$ Übergang nahezu identisch sind, erklärt, warum beim $O \rightarrow R$ Übergang, nur 3 und nicht mehr Phasen zu beobachten sind.

Blitzt man in Intervallen von 1Hz mehrmals auf die angelagerten Proteoliposomen im E-Zustand, so nimmt (ähnlich den Mehrfach-Blitz Experimenten ausgehend vom O-Zustand in Kapitel 2.2.) die Signalgröße immer mehr ab und das Vorzeichen dreht sich schließlich um (Abb. 3.17. zeigt die elektrischen Antworten auf 10 aufeinanderfolgende Blitze).

Dies kann man damit erklären, daß mit jedem Lichtblitz immer mehr COX-Moleküle den zweielektronenreduzierten Zustand R erreichen. Da unter CO-Atmosphäre gearbeitet wird, kann CO gebunden und der MV-CO Zustand gebildet werden. Diese Population wächst also mit jedem Laserblitz und kann nach Lichtanregung die in Kapitel 3.3.1.2. beschriebene Elektronenrückfluß-Reaktion durchlaufen. Die erhaltenen Signale sind also ein Gemisch aus der elektrogenen Antwort des $E \rightarrow R$ Übergangs und den elektrogenen Schritten beim Elektronenrückfluß. Wird häufig genug geblitzt, hat man schließlich nur noch den MV-CO Zustand vorliegen und beobachtet ausschließlich den Elektronenrückfluß.

Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, daß sich die erhaltenen Meßkurven mit der über Abb. 3.17. abgebildeten Gleichung recht gut simulieren lassen. Sie enthält die Zeitkonstanten und relativen Amplituden für den $E \rightarrow R$ Übergang (gewonnen aus dem 1. Laserblitz) sowie die Parameter für die Elektronenrückfluß-Reaktion (siehe Kapitel 3.3.1.2. und 4.3.). A1 und A2 stehen für die absolute Amplitude des reinen $E \rightarrow R$ Signals (aus 1. Laserblitz) bzw. des MV-CO Enzyms (nach sehr vielen Laserblitzen). Die einzige Variable stellt A dar, die den relativen Anteil der $E \rightarrow R$ Reaktion am Gesamtsignal verkörpert. Nach dem 6. Blitz besteht die elektrogene Antwort hier beispielsweise zu 60 % aus dem $E \rightarrow R$ Signal und 40 % aus der Elektronenrückfluß-Reaktion.

3.3.3.2. Spannungsmessungen an der D124N-Mutante

Führt man das in Kapitel 3.3.3.1. beschriebene Experiment mit der D124N-Mutante durch, so erhält man die in Abb. 3.18. dargestellten Meßkurven. Aus dem Anstieg des 1. Signals gewinnt man 2 Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 27 \mu\text{s}$ und $\tau_2 \approx 195 \mu\text{s}$, die zu etwa 63 % bzw. 37 % zum elektrischen Signal beitragen (Tab. 3.7.). Diese sind identisch mit den ersten beiden Phasen beim WT-Enzym. Die dritte, langsame Phase, fehlt dagegen vollständig.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mehrfach-Blitz Experimente, ausgehend vom oxidierten Zustand (siehe Kapitel 3.2.2.), weisen auch die hier gewonnenen Resultate darauf hin, daß der D-Weg am $E \rightarrow R$ Übergang beteiligt ist.

Bei Mehrfach-Blitz Experimenten, ausgehend vom E-Zustand, erhält man mit dieser Mutante analog zum WT nach einigen Laserblitzen eine Signalumkehr (Abb. 3.18.). Die erhaltenen Kurven können wiederum sehr gut mit einer Gleichung simuliert werden, die die Parameter für den $E \rightarrow R$ Übergang (diesmal ohne 3. Phase) und die Elektronenrückfluß-Reaktion anteilig enthält.

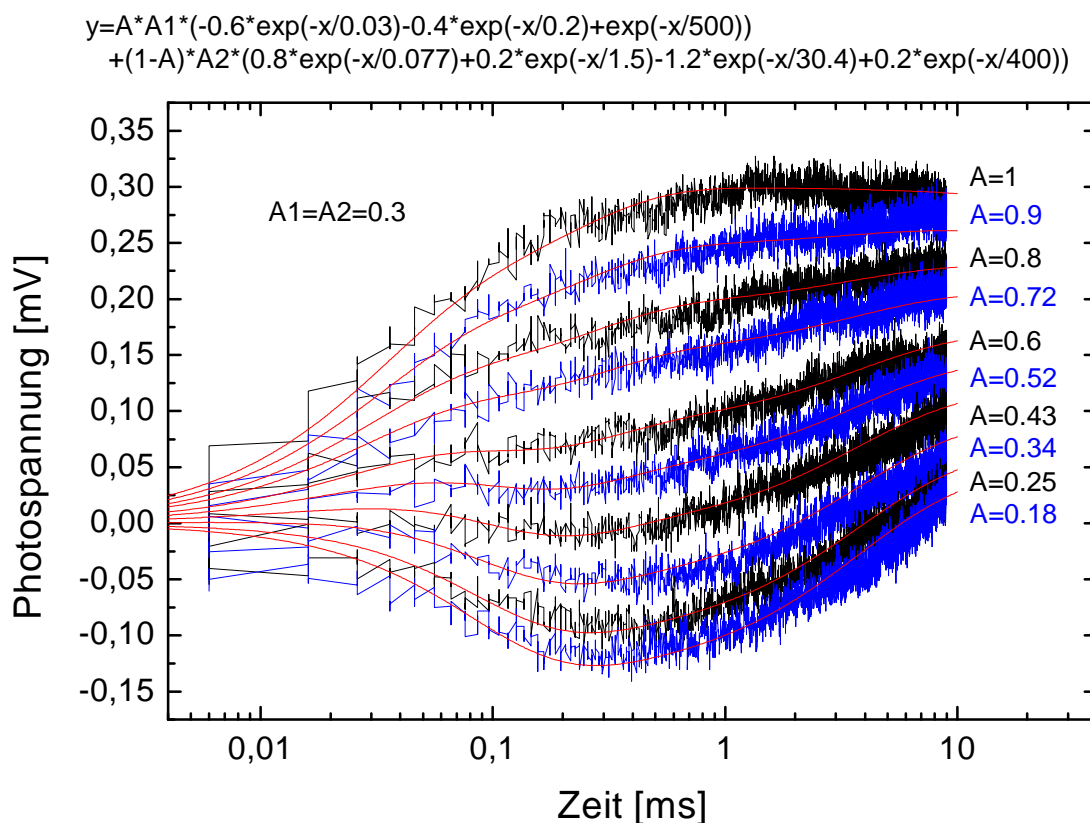


Abb. 3.18. Mehrfach-Blitz Experimente an der D124N-Mutante unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.

Bedingungen wie bei Abb. 3.17. beschrieben.

3.3.3.3. Spannungsmessungen an der K354M-Mutante

Mit der K354M-Mutante lässt sich wie in Kapitel 3.3.2.1. beschrieben der E-Zustand nur in sehr geringen Mengen einstellen. Versucht man es trotzdem und blitzt in Gegenwart von Rubpy auf die an die BLM angelagerten Liposomen, so erhält man die Abb. 3.19. dargestellten Signale.

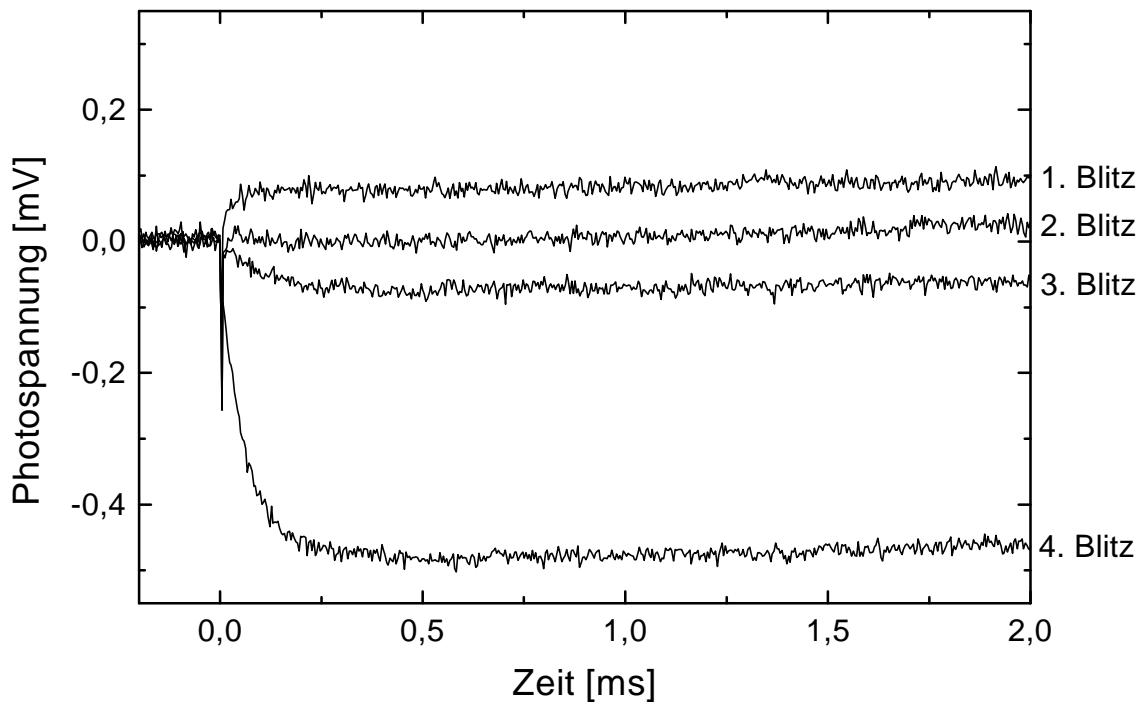


Abb. 3.19. Mehrfach-Blitz Experimente an der K354M-Mutante unter CO-Atmosphäre, ausgehend vom E-Zustand.

Die Signale sind diesmal nicht mit einer Frequenz von 1 Hz aufgenommen, sondern im Abstand von jeweils etwa 15 min.

Die elektrische Antwort auf den 1. Laserblitz lässt sich mit einer Exponentialfunktion mit $\tau_1 \approx 23 \mu\text{s}$ anpassen. Die beim WT beobachteten beiden langsamen Phasen fehlen völlig. In manchen Fällen tritt allerdings eine zusätzliche langsame Phase mit einer Zeitkonstanten von etwa 5 ms auf. Sollte es sich bei dem Signal wirklich um die Auswirkung einer an den $E \rightarrow R$ Übergang gekoppelten Reaktion handeln, so deutet das Ergebnis darauf hin, daß neben dem D-Weg auch der K-Weg an diesem Teilabschnitt des katalytischen Zyklus beteiligt ist. Dies paßt auch zu den Resultaten aus Kapitel 3.2. ($O \rightarrow R$ Übergang).

Auffällig ist, daß sich das Vorzeichen des Signals bereits nach dem 3. Blitz umkehrt. In Übereinstimmung mit den spektroskopischen Untersuchungen spricht dies dafür, daß bei der K354M-Mutante der E-Zustand instabil ist, schnell disproportioniert und den MV-CO Zustand bildet.

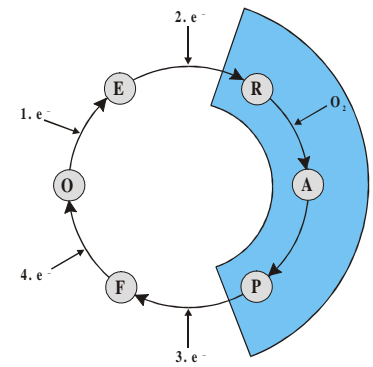
Tab. 3.7. faßt alle für den E \rightarrow R Übergang erhaltenen Ergebnisse nochmals zusammen.

Reaktion	WT		D124N		K354M	
	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.
E \rightarrow R	$\tau_1=26,9\pm7,5\mu\text{s}$	$0,26\pm0,09$	$\tau_1=27,2\pm8,9\mu\text{s}$	$0,63\pm0,10$	$\tau_1=22,7\pm6,0\mu\text{s}$	1
	$\tau_2=199\pm64\mu\text{s}$	$0,25\pm0,09$	$\tau_2=195\pm13\mu\text{s}$	$0,37\pm0,10$		
	$\tau_3=1,5\pm0,6\text{ms}$	$0,49\pm0,09$				

Tab. 3.7. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den E \rightarrow R Übergang bei WT, D124N und K354M.

3.4. Der R → P Übergang; Verwendung von *caged*-O₂

Um den oxidativen Teil des katalytischen Zyklus genauer zu untersuchen, gehen traditionelle Methoden oft vom MV-CO Enzym oder vollständig reduzierten, CO-vergifteten Protein aus und starten die Reaktion, indem die Probe mit einer sauerstoffgesättigten Lösung gemischt und sofort belichtet wird, um das CO wegzublitzen (*Flow-Flash-Experiment*).



An der BLM ist es aufgrund der Empfindlichkeit der schwarzen Lipidmembran nicht möglich, einen schnellen Lösungswechsel durchzuführen, ohne daß die Membran platzt. Aus diesem Grund sollte eine *caged*-Sauerstoff-Verbindung gefunden werden, die die Übertragung von Sauerstoff auf die COX nach einem Lichtblitz mit ausreichender Quantenausbeute erlaubt.

Erfolgversprechend erschienen hierbei (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)], daß bereits zur Herstellung von Oxyhämoglobin aus Deoxyhämoglobin (MacArthur et al., 1995) und kürzlich auch mit COX (Van Eps et al., 2000) verwendet wurde sowie (μ -superoxo)bis[pentaammincobalt(III)], das laut einem Posterabstract (Van Eps und Einarsdóttir, 1998) für Untersuchungen an COX geeignet sein soll.

3.4.1. Eigenschaften von (μ -superoxo)bis[pentaammincobalt(III)] und (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)]

Das Problem vieler potentieller *caged*-Sauerstoff Verbindungen ist, daß sie im physiologischen pH-Bereich kaum oder gar nicht löslich sind. Auch das hier verwendete saure Sulfat des Superoxo-Komplexes ist nur wenig wasserlöslich (< 1mM). Derselbe Komplex in Form des Perchlorats wäre zwar besser löslich, hochkonzentrierte Lösungen (≈ 0.1 M) zerfallen allerdings in wenigen Minuten (Ebsworth und Weil, 1959), und die Synthese dieser Verbindung gelang nicht.

Die geringe Löslichkeit der Superoxo-Verbindung wird allerdings durch eine hohe Quantenausbeute für die Sauerstofffreisetzung ($\phi=0.3$ bei 350 nm; Valentine und Valentine, 1971) wieder wett gemacht. Beim Peroxo-Komplex liegt sie bei $\phi=0.04$ (355 nm; MacArthur et al., 1995).

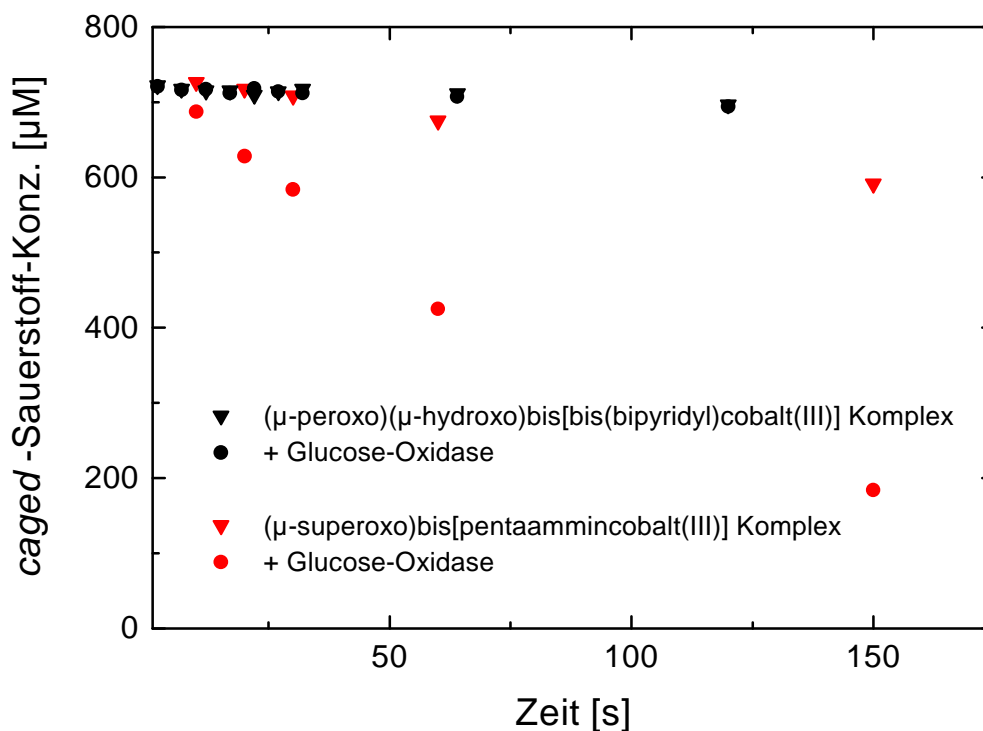


Abb. 3.20. Stabilität von *caged*-O₂ in Gegenwart von Glucose-Oxidase.

Die *caged*-Sauerstoff-Konzentration wurde spektroskopisch bei 390 nm (Peroxo-Komplex; $\epsilon_{390} = 1540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; MacArthur et al., 1995) bzw. 670 nm (Superoxo-Komplex; $\epsilon_{670} = 835 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; Valentine und Valentine, 1971) bestimmt. Bedingungen: 725 μM *caged*-O₂, 40 $\mu\text{g/ml}$ Glucose-Oxidase, 50 mM Hepes/KOH pH 7.4.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Güte des *caged*-Sauerstoff ist seine Stabilität. Aus diesem Grund wurde diese durch Zugabe der einzelnen Komponenten des Standardpuffers (150 mM β -D-Glucose, 40 $\mu\text{g/ml}$ Glucose-Oxidase, 25 $\mu\text{g/ml}$ Katalase, 80 μM Rubpy, 300 μM EDTA, 200 μM Ferricyanid) überprüft. Abb. 3.20. zeigt die Stabilität der beiden *caged*-Sauerstoff Verbindungen in Gegenwart von Glucose-Oxidase. Während dieses Enzym auf den Peroxo-Komplex keinen Einfluß besitzt, zerfällt die Superoxo-Verbindung recht schnell. Im folgenden wurde daher nur noch $(\mu\text{-peroxo})(\mu\text{-hydroxo})\text{bis-}[\text{bis}(\text{bipyridyl})\text{cobalt(III)}]$ verwendet.

In Abb. 3.21. sind die UV-Vis-spektroskopischen Veränderungen des Peroxo-Komplexes bei Belichtung mit 396 nm Laserpulsen dargestellt. Die braune $[(\mu\text{-O}_2)(\mu\text{-OH})(\text{Co}(\text{bpy})_2)_2]^{3+}$ Lösung zeigt das typische Spektrum eines zweifach verbrückten Kobalt-Komplexes, eine breite Absorptionsbande bei $\approx 396 \text{ nm}$ mit einer Schulter bei $\approx 460 \text{ nm}$. Die 396 nm und die 216 nm Bande verschwinden während der Photodissoziation. Weiterhin nimmt bei Bestrahlung die Absorption bei $\approx 318 \text{ nm}$ ab, bei $\approx 294 \text{ nm}$ dagegen zu (MacArthur et al., 1995).

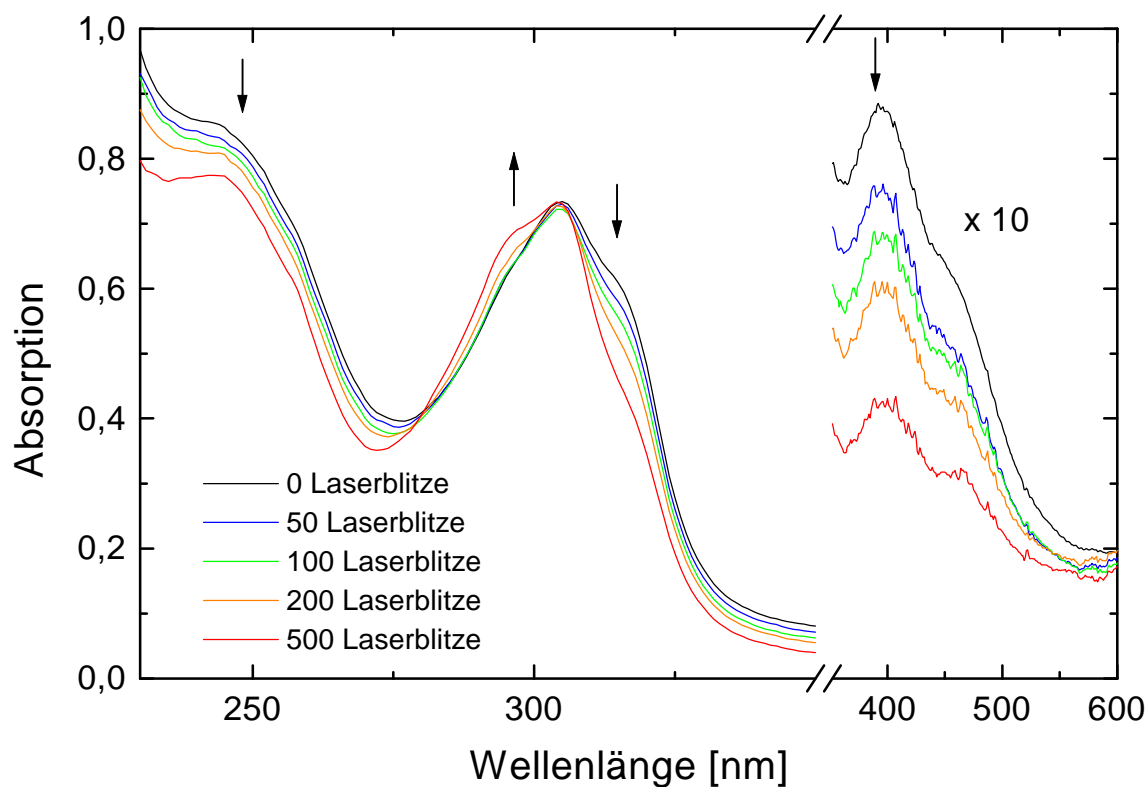
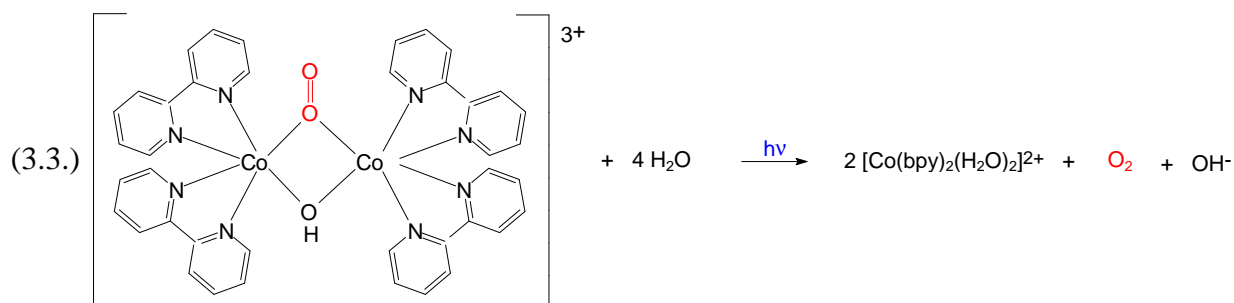


Abb. 3.21. Absorptionsänderungen nach Belichtung des Peroxo-Komplexes.

Lichtquelle: XeCl-Excimerlaser gepumpter Breitband-Farbstofflaser und PBBO als Farbstoff (396 nm, 1 Hz, ca. 5 mJ pro Puls). Bedingungen: 57 μM (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)], 50 mM Hepes/KOH pH 7.4.

Das UV-Vis Spektrum des Photolyse-Endproduktes stimmt mit dem bei (Skurlatov und Pourmal, 1971) für den $[\text{Co}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ Komplex beschriebenen Spektrum überein.

All dies zusammengekommen zeigt, daß es sich bei der synthetisierten Substanz tatsächlich um die Peroxo-Verbindung handelt. Bei Belichtung zersetzt sich der Komplex und Sauerstoff wird vermutlich gemäß folgender Gleichung freigesetzt (MacArthur et al., 1995):



3.4.2. Spannungsmessungen am MV-CO Enzym in Gegenwart des Peroxo-Komplexes

Belichtet man das MV-CO Enzym in Gegenwart von ausreichend Sauerstoff, so kann der Reaktionszyklus über den A-Zustand bis zum P-Zustand durchlaufen werden. Wikströms Gruppe konnte zeigen (Jasaitis et al., 1999), daß der $R \rightarrow P$ Übergang nicht elektrogen ist und somit bei elektrischen Messungen kein Spannungssignal zeigt. Diese Reaktion sollte daher hier genutzt werden, um die Wirkung der *caged*-Sauerstoff Verbindung (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)] auf COX zu überprüfen.

Stellt man unter anaeroben Bedingungen den MV-CO Zustand an der BLM ein, so erhält man nach Blitzlicht-Photolyse das in Kapitel 3.3.1. beschriebene Signal. Fügt man nun der lichtabgewandten Küvettenhälfte den Peroxo-Komplex zu, ändert sich nach Belichtung die Signalform. Abb. 3.22. (A) faßt die bei verschiedenen *caged*-Sauerstoff Konzentrationen erhaltenen elektrischen Signale zusammen.

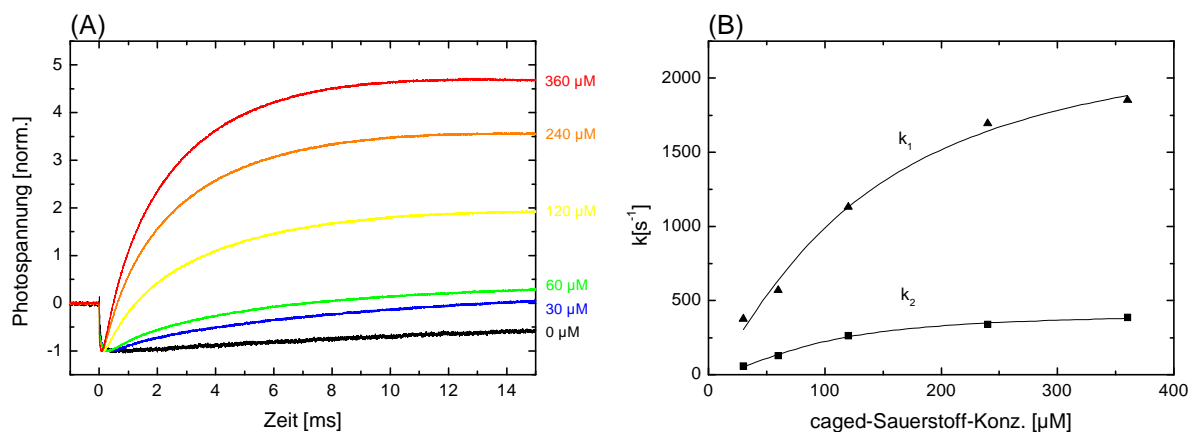


Abb. 3.22. Abhängigkeit der Photospannung von der *caged*-Sauerstoff-Konzentration.

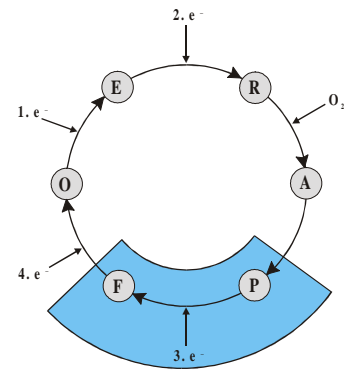
- (A) Ausgehend vom MV-CO Enzym wurde sukzessiv die Konzentration des Peroxo-Komplexes erhöht und anschließend jeweils einmal mit 308 nm geblitzt. Bis zum nächsten Laserblitz ist freigesetztes O_2 durch das Glucose-Oxidase / Katalase-System wieder verbraucht. Die Größe des anfänglichen Spannungsabfalls bleibt bei den gewählten *caged*-Sauerstoff-Konzentrationen nahezu konstant. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auf dieses negative Signal normiert.
- (B) Abhängigkeit der beiden Geschwindigkeitskonstanten für den Potentialanstieg k_1 und k_2 von der *caged*-Sauerstoff-Konzentration.

Bei jeder der verwendeten *caged*-Sauerstoff-Konzentrationen beobachtet man zunächst ein negatives Signal analog dem MV-CO Enzym. Dies deutet darauf hin, daß auch bei Zugabe von 360 μM Peroxo-Verbindung ein Elektronenrückfluß vom binuklearen Zentrum über Häm *a* zum Cu_A stattfindet, da vermutlich nicht genügend Sauerstoff freigesetzt wird. Der sich an das negative Signal anschließende Spannungsanstieg wird dagegen mit zunehmendem *caged*- O_2 immer ausgeprägter und schneller (siehe Abb. 3.22 (B)) und erreicht bei 360 μM (μ -peroxo)(μ -hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)] Geschwindigkeitskonstanten von $k_1 \approx 1850 \text{ s}^{-1}$ ($\tau_1 \approx 540 \text{ }\mu\text{s}$) und $k_2 \approx 385 \text{ s}^{-1}$ ($\tau_2 \approx 2.6 \text{ ms}$). Die relativen Amplituden bleiben bei allen Konzentrationen konstant bei $\alpha_1 \approx 0.25$ und $\alpha_2 \approx 0.75$.

3.5. Der P → F Übergang

Der P → F Übergang ist ein Teilschritt der oxidativen Hälfte des katalytischen Zyklus und wurde bereits intensiv untersucht. Daß während dieses Übergangs mindestens ein Proton gepumpt wird, steht unbestritten fest und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden bereits gezeigt

(Wikström, 1989; Siletsky et al., 1999). Ob nun aber zwei Protonen oder nur ein Proton transloziert wird oder ob sich mitochondrielle und bakterielle COX mechanistisch gar unterscheiden, ist nach wie vor unklar. Aus diesem Grund erscheint es lohnenswert, sich diesen Abschnitt des katalytischen Zyklus am *Paracoccus*-Enzym mit der BLM-Methode genauer anzuschauen.



3.5.1. Einstellen des Peroxy-Zustandes P

Zum Einstellen des P-Zustandes sind bereits eine Reihe von Methoden beschrieben worden, darunter

- Behandlung des oxidierten Zustands mit substöchiometrischen Mengen H_2O_2 unter alkalischen Bedingungen (Wrigglesworth, 1984; Weng und Baker, 1991; Fabian und Palmer, 1995).
- Begasen des oxidierten Proteins mit Kohlenmonoxid in Gegenwart von Sauerstoff (Nicholls und Chanady, 1981).
- Herstellen des MV-CO Enzyms und anschließendes Begasen mit Sauerstoff (Chance et al., 1975).

Zu beachten hierbei ist, daß verschiedene Formen des P-Zustandes existieren, die auch unterschiedliche Eigenschaften besitzen. In dieser Arbeit steht P für die zweielektronenreduzierte Sauerstoffspezies.

Für die Herstellung des P-Zustandes wurde hier Ansatz c) gewählt, da dieser die höchsten Ausbeuten an P verspricht. Abb. 3.23. zeigt das Differenzspektrum (P minus O) mit der für den P-Zustand charakteristischen Bande bei 607 nm. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon(607-630\text{nm})=12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mitchell et al., 1992b) konnte bei ersten Versuchen eine Konzentration von bis zu 50 % P berechnet werden. Optimiert man das Verfahren, sind sicher höhere Ausbeuten möglich. So scheint z.B. auch die Enzymkonzentration eine Rolle zu spielen, denn bei geringerer Konzentration ist der P-Zustand länger stabil.

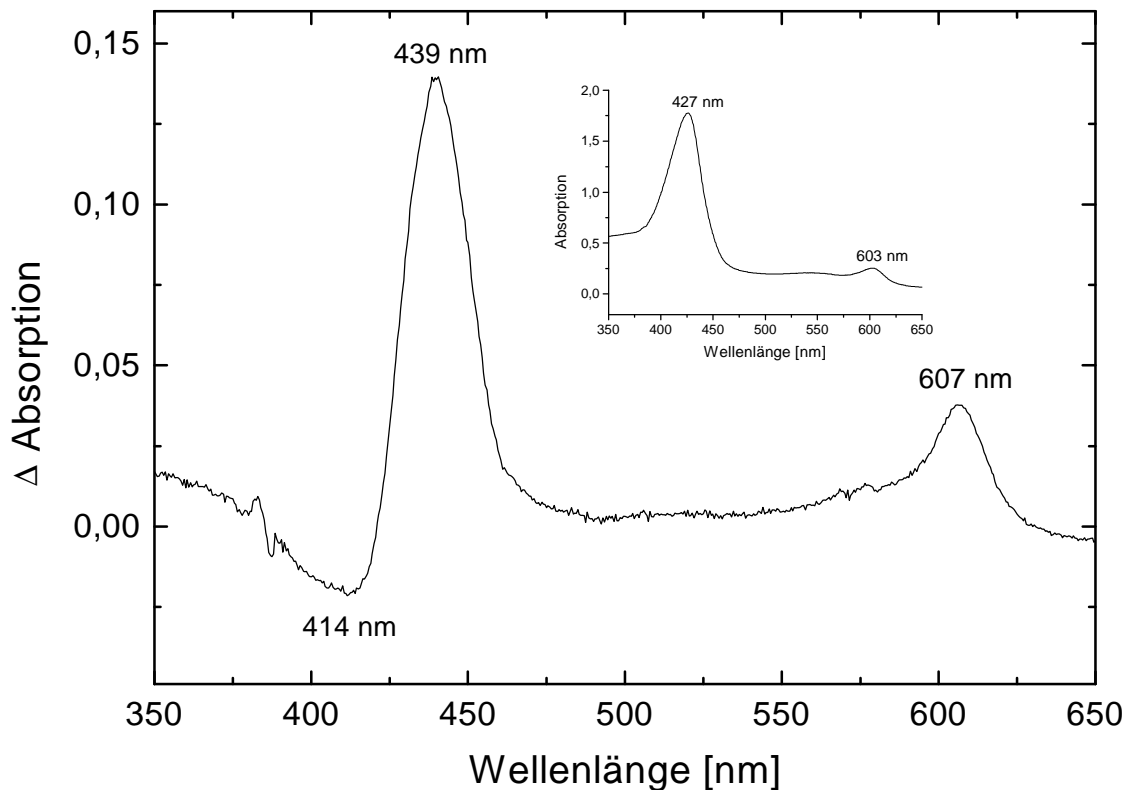


Abb. 3.23. Differenzspektrum P minus O.

10 μ M solubilisierter COX in 0,05 % LM, 50 mM Hepes/KOH pH 7.4 wurden zweimal entgast und mit Argon begast, 1 h unter CO-Atmosphäre inkubiert und anschließend 3 min mit Sauerstoff behandelt. Das Differenzspektrum zeigt ein Minimum bei 414 nm und die charakteristischen Banden bei 439 und 607 nm.

Eingefügtes Bild: Absolutspektrum.

3.5.2. Spannungsmessungen am P-Zustand in Gegenwart von Rubpy

Es sei darauf hingewiesen, daß es sich bei den nachfolgenden Messungen lediglich um 1 Experiment handelt. Die Ergebnisse werden trotzdem gezeigt, um zu demonstrieren, daß es sich lohnt, hier noch weitere Experimente durchzuführen.

In Abb. 3.24. ist die elektrische Antwort auf die photochemische Reduktion des P-Zustandes dargestellt. Nach dem Laserblitz zum Zeitpunkt Null ist zunächst wieder das schnelle, negative Rubpy-Artefakt zu erkennen. Der folgende Anstieg läßt sich durch 3 Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 16 \mu$ s, $\tau_2 \approx 90 \mu$ s und $\tau_3 \approx 630 \mu$ s mit relativen Amplituden von $\alpha_1 \approx 0.2$, $\alpha_2 \approx 0.6$ bzw. $\alpha_3 \approx 0.2$ beschreiben. Das Signal relaxiert anschließend mit der Systemzeit. Fügt man 2 mM KCN hinzu, so verschwinden die beiden langsameren Phasen vollständig, während der 16 μ s-Prozeß unbeeinflusst bleibt.

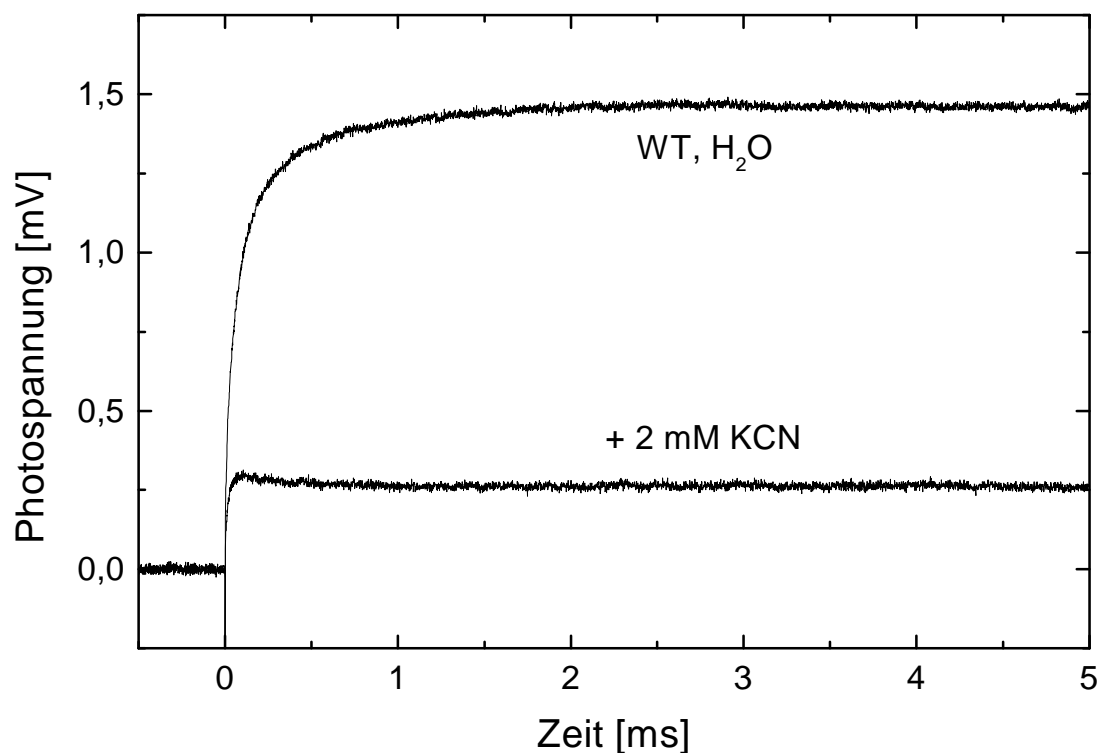


Abb. 3.24. Ausbildung eines Membranpotentials nach Einelektronenreduktion des P-Zustandes.

Der P-Zustand wurde hergestellt, indem an die BLM angelagerte Proteoliposomen 1 h unter Kohlenmonoxid- und anschließend 15 min unter Sauerstoff-Atmosphäre inkubiert wurden. WT, H₂O bezeichnet eins von 15 Signalen, die im Abstand von etwa 5 min aufgenommen wurden und allesamt dieselbe Signalförm besaßen. Nach beidseitiger Zugabe von 2 mM KCN verringert sich die Signalgröße auf 1/5 der ursprünglichen.

Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 3.8. nochmals zusammengefaßt.

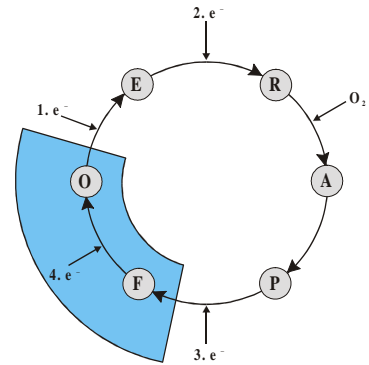
Reaktion	WT, H ₂ O	
	Zeitkonst.	rel. Amp.
P → F	$\tau_1 = 15,9 \pm 3,2 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 0,21 \pm 0,02$
	$\tau_2 = 91,5 \pm 5,5 \mu\text{s}$	$\alpha_2 = 0,56 \pm 0,03$
	$\tau_3 = 633 \pm 66 \mu\text{s}$	$\alpha_3 = 0,23 \pm 0,01$
+ KCN	$\tau_1 = 15,1 \pm 3,1 \mu\text{s}$	$\alpha_1 = 1$

Tab. 3.8. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den P → F Übergang.

Zu beachten ist, daß es sich hierbei nur um die Ergebnisse eines Experimentes handelt. Die angegebenen Zeitkonstanten und relativen Amplituden sind der Mittelwert aus 10 Signalen. Gezeigt sind nur die Parameter für den Anstieg des Signals.

3.6. Der F → O Übergang

Der F → O Übergang wurde bereits mit spektroskopischen (Nilsson, 1992; Zaslavsky et al., 1998) und elektrischen Messungen (Zaslavsky et al., 1993; 1995; Konstantinov et al., 1997) sowohl am Rinderherz-Enzym als auch an bakterieller COX aus *Rb. sphaeroides* intensiv untersucht. Diese



Veröffentlichungen bildeten die Grundlage für die vorgestellten Messungen an der BLM und dienten als Referenz beim Aufbau des Setups. Da der F-Zustand auch ein Zwischenprodukt bei der Herstellung des E-Zustandes darstellt (siehe Kapitel 3.3.), soll hier kurz auf optische und elektrische Eigenschaften dieser Spezies beim *Paracoccus*-Enzym eingegangen werden.

3.6.1. Einstellen des Ferryl-Zustandes F

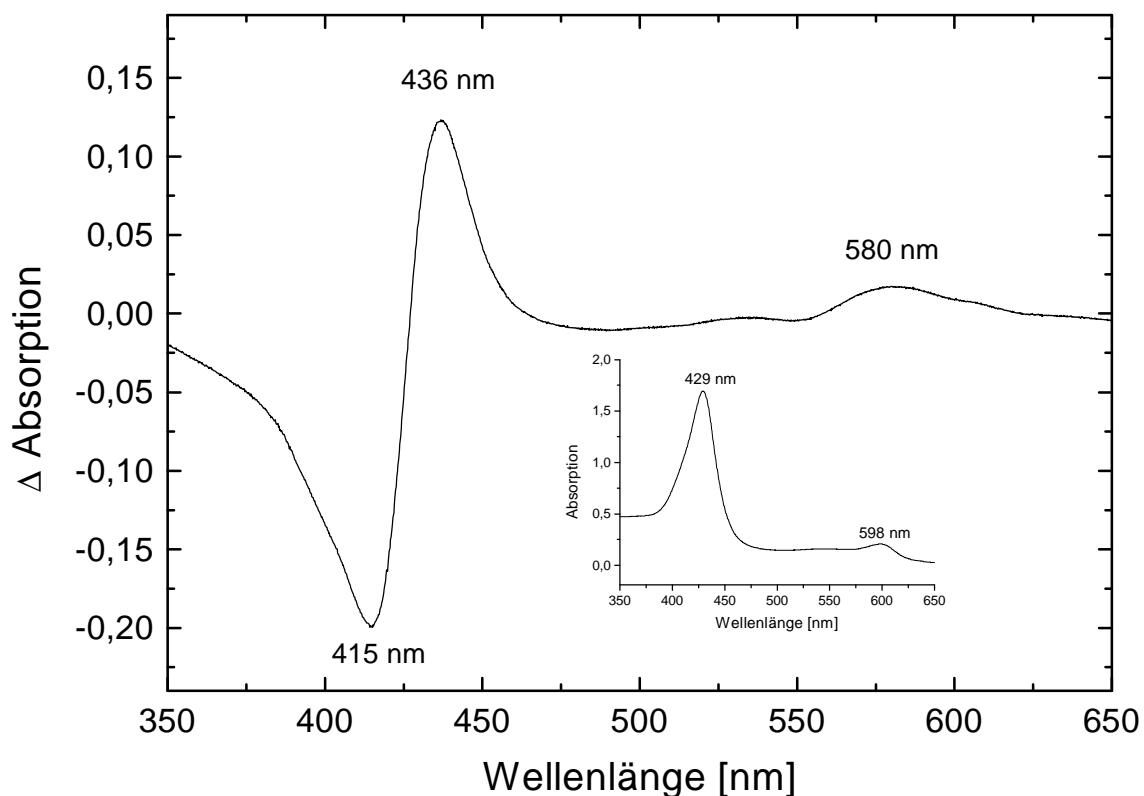


Abb. 3.25. Differenzspektrum F minus O.

10 μM solubilisierte COX in 0,05 % LM, 50 mM Hepes/KOH pH 7.4 wurde 25 min mit 1 mM H_2O_2 inkubiert. Das Differenzspektrum zeigt ein Minimum bei 415 nm, ein Maximum bei 439 nm und die charakteristische breite Bande bei 580 nm. Eingefügtes Bild: Absolutspektrum.

Abb. 3.25. zeigt das UV/Vis-Spektrum des Ferryl-Zustandes sowie das Differenzspektrum F minus O. Durch Zugabe von H_2O_2 zum oxidierten Zustand kann das Enzym bis nahezu 100% in die Ferryl-Form überführt werden (Fabian und Palmer, 1995). Beim Einstellen dieses Zustandes ist es wichtig, die richtige H_2O_2 -Konzentration zu verwenden. Setzt man zu wenig ein, so erhält man ein Gemisch aus P und F. Fügt man allerdings zuviel zu, so sinkt die Ausbeute an F deutlich. Ein 10 bis 100facher Überschuß H_2O_2 scheint optimal zu sein.

3.6.2. Spannungsmessungen am F-Zustand in Gegenwart von Rubpy

Läßt man WT-Liposomen an die BLM anlagern und inkubiert 20 bis 30 min mit 10 bis 100fachem Überschuß H_2O_2 , erhält man nach Lichtanregung in Gegenwart von Rubpy das in Abb. 3.26. schwarz abgebildete Spannungssignal. Dieses läßt sich im Anstieg durch 3 Exponentialfunktionen beschreiben und liefert Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 25 \mu\text{s}$, $\tau_2 \approx 270 \mu\text{s}$ und $\tau_3 \approx 1.5 \text{ ms}$ mit relativen Amplituden von $\alpha_1 \approx 0.3$, $\alpha_2 \approx 0.23$ bzw. $\alpha_3 \approx 0.47$. Die erhaltenen Parameter entsprechen den publizierten Werten für *Rb. sphaeroides* COX ($\tau_1 \approx 15 \mu\text{s}$, $\tau_2 \approx 400 \mu\text{s}$ und $\tau_3 \approx 1.5 \text{ ms}$ mit $\alpha_1 \approx 0.3$, $\alpha_2 \approx 0.2$ bzw. $\alpha_3 \approx 0.5$; Konstantinov et al., 1997).

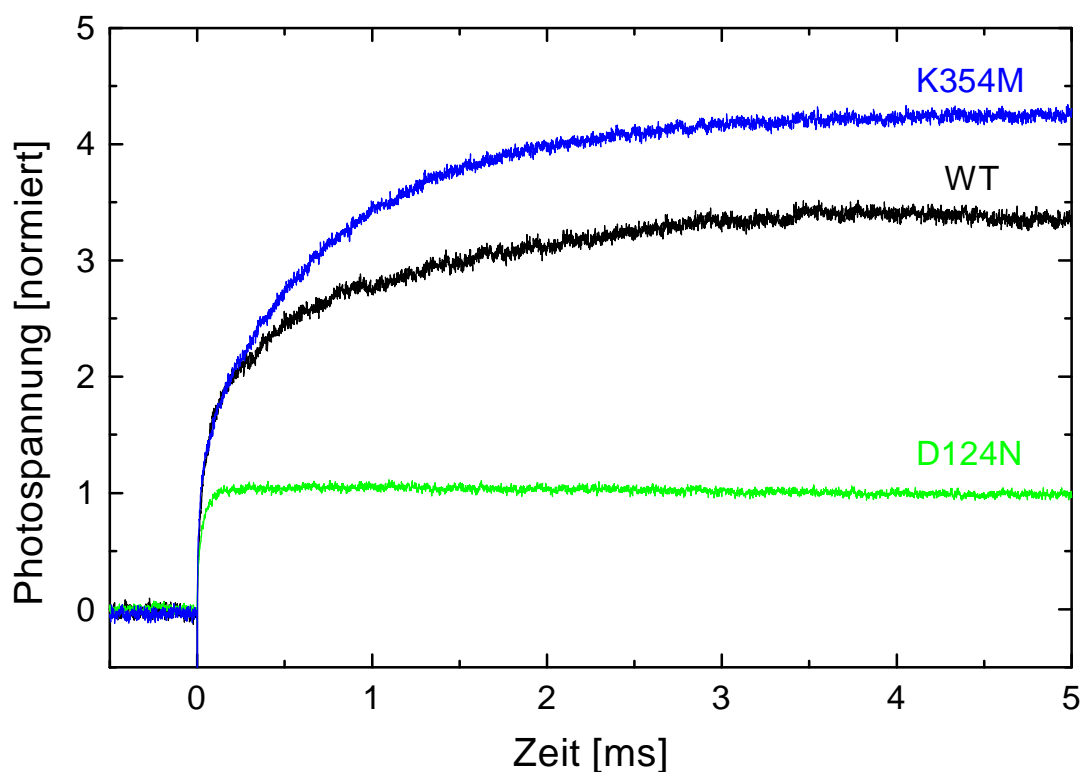


Abb. 3.26. Elektrogene Schritte beim $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang in WT, K354M und D124N.

Einelektronenreduktion des WT-Enzyms (schwarz), der K354M- (blau) und der D124N-Mutante (grün) bei pH 7.4., ausgehend vom Oxoferryl-Zustand. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Signale auf die schnelle Phase normiert.

Zugabe von 2 mM KCN führt zur vollständigen Inhibition der beiden langsamen Phasen.

Führt man dasselbe Experiment mit der K354M-Mutante durch, so erhält man die in Abb. 3.26. blau dargestellte elektrogene Antwort. Interessant ist, daß sich diese inaktive Mutante, die nahezu keinen *steady-state turnover* zeigt, während des $F \rightarrow O$ Übergangs praktisch wie der Wildtyp verhält und sogar eine ausgeprägtere dritte Phase besitzt. Bei diesem Teil des katalytischen Zyklus scheint der K-Weg also weder bei der Protonenaufnahme noch beim Protonenpumpen beteiligt zu sein.

Die D124N-Mutante zeigt das in Abb. 3.26. grün dargestellte elektrische Verhalten. Der Anstieg des Signals läßt sich mit nur einer Exponentialfunktion anpassen und liefert $\tau_1 \approx 25 \mu\text{s}$. Die beiden langsamen Phasen sind vollständig inhibiert. Beim $F \rightarrow O$ Übergang werden also wahrscheinlich alle Protonen über den D-Weg aufgenommen.

Tabelle 3.9. faßt die für den $F \rightarrow O$ Übergang gewonnenen Parameter nochmals zusammen.

Reaktion	WT		K354M		D124N	
	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.	Zeitkonst.	rel. Amp.
F \rightarrow O	$\tau_1=25,6\pm7,7\mu\text{s}$	$0,30\pm0,08$	$\tau_1=26,0\pm4,8\mu\text{s}$	$0,23\pm0,01$	$\tau_1=24,4\pm7,5\mu\text{s}$	1
	$\tau_2=269\pm105\mu\text{s}$	$0,23\pm0,06$	$\tau_2=267\pm89\mu\text{s}$	$0,15\pm0,03$		
	$\tau_3=1,5\pm0,5\text{ms}$	$0,47\pm0,09$	$\tau_3=1,0\pm0,1\text{ms}$	$0,62\pm0,04$		

Tab. 3.9. Zeitkonstanten und relative Amplituden für den $F \rightarrow O$ Übergang bei WT, K354M und D124N.

3.7. Einfluß von Zn^{2+} auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus

Es ist schon lange bekannt, daß eine Reihe von Schwermetallen, darunter Zn^{2+} , die Zellatmung inhibieren können (Skulachev et al., 1967). Inspiriert durch kürzlich erschienene Veröffentlichungen, in denen durch Kristallisation die Zink-Bindestellen im Reaktionszentrum aus *Rb. sphaeroides* (Paddock et al., 1999; Axelrod et al., 2000) und in der mitochondrialen Ubichinol Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (bc_1 Komplex) aus Huhn (Berry et al., 2000) bestimmt werden konnten, sollte der Einfluß dieses Protonentransfer-Inhibitors auf COX untersucht werden.

3.7.1. Zn^{2+} innerhalb der Liposomen

Mit Hilfe von spektrophotometrischen Protonenpumpmessungen an einer stopped-flow Apparatur konnte gezeigt werden, daß die H^+/e^- Stöchiometrie bei steigender Konzentration von in COX-Proteoliposomen eingeschlossenem Zn^{2+} allmählich sinkt (Kannt et al. 2001). Halbmaximale Inhibition wurde bei $[\text{Zn}^{2+}]_i = 75 \mu\text{M}$ beobachtet, was 5 – 6 Zn^{2+} Ionen pro COX Molekül entspricht. Zusätzlich wurde eine signifikante Zunahme der RCR (*respiratory control ratio*) der Proteoliposomen mit steigender interner ZnCl_2 Konzentration nachgewiesen. Aus diesem Grund sollten elektrische Messungen durchgeführt werden, um hieraus eventuell eine Aussage machen zu können, wo Zink bindet. Um zwischen den beiden Protonentransferwegen zu unterscheiden, wurden der $\text{O} \rightarrow \text{E}$ bzw. $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang genauer untersucht, da hier jeweils selektiv nur der K- bzw. D-Weg zur Protonenaufnahme genutzt wird (siehe Kapitel 3.1. und 3.6.)

Schließt man $100 \mu\text{M}$ Zn^{2+} in WT-Proteoliposomen ein, trennt externes Zink über Gelfiltration ab und lagert die Vesikel an die BLM an, so erhält man in Gegenwart von Rubpy/EDTA und Ferricyanid nach einem Laserblitz das in Abb. 3.27. (A) grau dargestellte Signal. Während im Vergleich zu Proteoliposomen ohne internem Zn^{2+} (schwarze Kurve) die Zeitkonstante der schnellen Phase mit $\tau_1 \approx 34 \mu\text{s}$ nur minimal größer ist (siehe Tab. 3.10.), wird die 2. Phase mit $\tau_2 \approx 1.6 \text{ ms}$ deutlich verlangsamt. Ein ähnlicher Effekt kann beim $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang beobachtet werden (Abb. 3.27. (B)): der $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer ist mit $\tau_1 \approx 33 \mu\text{s}$ kaum beeinflusst, die beiden anderen Phasen mit $\tau_2 \approx 1.9 \text{ ms}$ und $\tau_3 \approx 13 \text{ ms}$ dagegen stark verlangsamt. Zusätzlich sind bei beiden Übergängen in Gegenwart von Zn^{2+} die Amplituden der Protonentransferprozesse deutlich kleiner (siehe Tab. 3.10.).

Aus diesen Messungen kann geschlußfolgert werden, daß Zn^{2+} Ionen in den Vesikeln den Protonentransfer sowohl über den K- als auch über den D-Weg inhibieren.

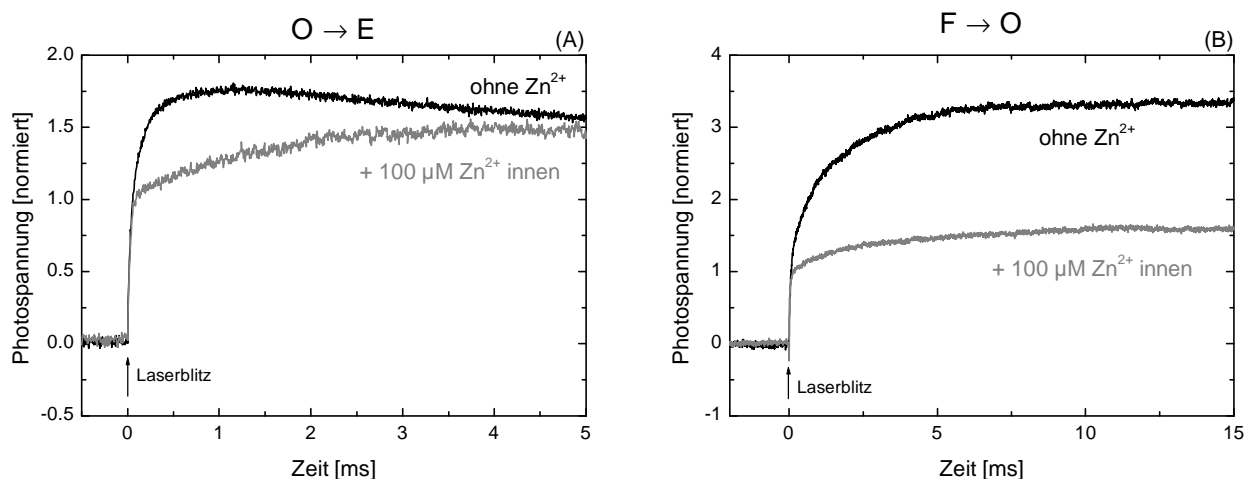


Abb. 3.27. Einfluß von internem Zn^{2+} auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus von COX.

(A) Elektrische Antwort beim O \rightarrow E Übergang in Abwesenheit (schwarze Kurve) und Gegenwart (graue Kurve) von 100 μM eingeschlossenem Zn^{2+} .

(B) Beim F \rightarrow O Übergang erzeugte Photospannung in Abwesenheit (schwarze Kurve) und Gegenwart (graue Kurve) von 100 μM internem $ZnCl_2$.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Signale auf die schnelle Phase normiert.

O \rightarrow E		F \rightarrow O	
kein Zn^{2+}	100 μM Zn^{2+}	kein Zn^{2+}	100 μM Zn^{2+}
$\tau_1 = 21,7 \pm 5,5 \mu s$	$\tau_1 = 34,3 \pm 5,2 \mu s$	$\tau_1 = 25,6 \pm 7,7 \mu s$	$\tau_1 = 33,3 \pm 3,0 \mu s$
$\alpha_1 = 0,57 \pm 0,10$	$\alpha_1 = 0,72 \pm 0,04$	$\alpha_1 = 0,30 \pm 0,08$	$\alpha_1 = 0,60 \pm 0,01$
$\tau_2 = 176 \pm 50 \mu s$	$\tau_2 = 1,55 \pm 0,53 ms$	$\tau_2 = 269 \pm 105 \mu s$	$\tau_2 = 1,91 \pm 0,47 ms$
$\alpha_2 = 0,43 \pm 0,10$	$\alpha_2 = 0,28 \pm 0,04$	$\alpha_2 = 0,23 \pm 105 \mu s$	$\alpha_2 = 0,26 \pm 0,03$
		$\tau_3 = 1,5 \pm 0,5 ms$	$\tau_3 = 13,4 \pm 0,9 ms$
		$\alpha_3 = 0,47 \pm 0,09$	$\alpha_3 = 0,14 \pm 0,03$

Tab. 3.10. Einfluß von internem Zn^{2+} auf die Zeitkonstanten verschiedener Teilschritte im katalytischen Zyklus von COX.

Deutliche Unterschiede sind rot hervorgehoben.

3.7.2. Zn^{2+} außerhalb der Liposomen

Abb. 3.28. zeigt den Einfluß externen Zinks auf elektrogene Schritte während des $\text{O} \rightarrow \text{E}$ (A) und des $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergangs (B).

$\text{O} \rightarrow \text{E}$.

- Zugabe eines 3000fachen Zn^{2+} -Überschusses zum oxidierten Zustand führt in Gegenwart von Rubpy (ohne EDTA !) nach Lichtanregung zur vollständigen Inhibition der langsamen Phase τ_2 (Abb. 3.28. (A), Kurve 2, grau). Die schnelle Zeitkonstante τ_1 wird zwar nicht beeinflusst, wohl aber ihre Amplitude, die deutlich verringert wird.
- EDTA ist ein Chelator, der zweiwertige Kationen komplexieren und somit „unschädlich“ machen kann. Nach Zugabe von 3 mM EDTA beobachtet man einen deutlichen Anstieg der Signalgröße (Abb. 3.28. (A), Kurve 3, violett) im Vergleich zum Zn^{2+} -inhibierten Enzym. Das ursprüngliche Signal (Abb. 3.28. (A), Kurve 1, schwarz) wird aber bei dieser EDTA-Konzentration nicht vollständig wieder hergestellt.
- Zugabe von KCN, das am binuklearen Zentrum bindet und alle Vorgänge dort inhibiert, führt wiederum zum vollständigen Verlust der langsamen Phase (Abb. 3.28. (A), Kurve 4, magenta). Ein Vergleich mit Kurve 2 verdeutlicht nochmals den Einfluß von Zn^{2+} auf die Amplitude des $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfers.

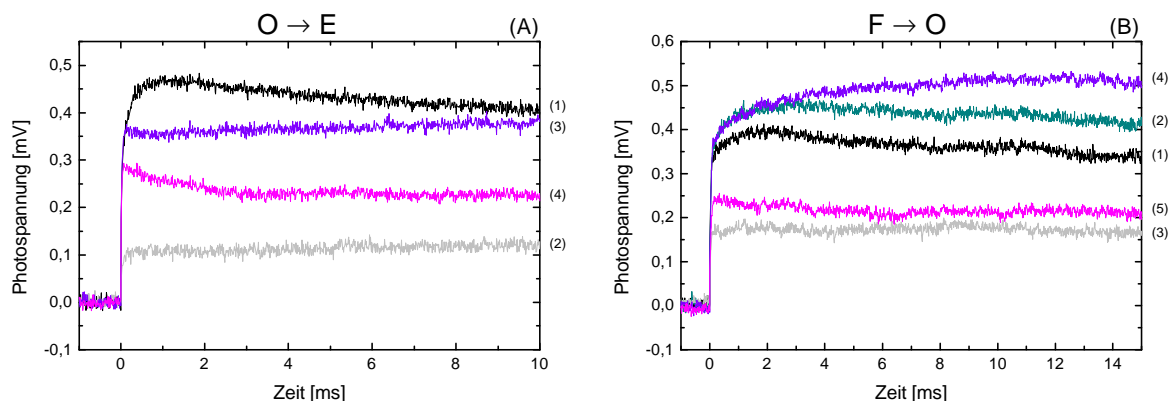


Abb. 3.28. Einfluß von externem Zn^{2+} auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus von COX.

(A) $\text{O} \rightarrow \text{E}$ Übergang. Ausgehend vom oxidierten Zustand O sind die verschiedenen Signale das Ergebnis sukzessiver Zugabe von (1) 80 μM Rubpy; (2) 300 μM Zn^{2+} (3000 facher Überschuß); (3) 3 mM EDTA; (4) 2 mM KCN.

(B) $\text{F} \rightarrow \text{O}$ Übergang. Ausgehend vom oxidierten Zustand O sind die verschiedenen Signale das Ergebnis sukzessiver Zugabe von (1) 80 μM Rubpy; (2) 10 μM H_2O_2 (100facher Überschuß); (3) 100 μM Zn^{2+} (1000facher Überschuß); (4) 1,5 mM EDTA; (5) 2 mM KCN.

$F \rightarrow O$

- Durch Behandlung mit H_2O_2 wird das Enzym in den F-Zustand überführt und anschließend mittels Rubpy reduziert (Abb. 3.28.(B), Kurve 2, türkis; anhand der Amplitude der 3. Phase erkennt man, daß in diesem Fall der F-Zustand noch nicht vollständig ausgebildet ist, da noch nicht lang genug mit H_2O_2 inkubiert wurde).
- Zugabe von $100\ \mu M\ Zn^{2+}$ zum Oxoferryl-Zustand bewirkt nach Belichtung in Gegenwart von Rubpy (ohne EDTA !) den vollständigen Verlust der beiden langsamen Phasen (Abb. 3.28. (B), Kurve 3, grau). Die schnelle Zeitkonstante bleibt dagegen unbeeinflusst, die Amplitude der $20\ \mu s$ -Phase nimmt aber ab, allerdings nicht so stark wie bei Anwesenheit von $300\ \mu M$ externem Zn^{2+} . COX zeigt unter diesen Bedingungen beim $F \rightarrow O$ Übergang dasselbe Verhalten wie beim $O \rightarrow E$ Übergang.
- Zugabe von $1.5\ mM$ EDTA bewirkt die vollständige Wiederherstellung des $F \rightarrow O$ Signals (Abb. 3.28 (B) Kurve 4, violett).
- KCN inhibiert die beiden langsamen Phasen (Abb 3.28 (B), Kurve 5, magenta).

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Aktivitätsmessungen an rekonstituierter COX (spektroskopische Verfolgung der Ferrocytochrom *c* Oxidation). Behandelt man WT-COV (Enzym-Konz. $1.25\ nM$) mit $500\ \mu M\ Zn^{2+}$ im externen Medium (\rightarrow 400000facher Überschuß), führt dies zum vollständigen Verlust der Aktivität. Verwendet man dagegen eine höhere Enzym-Konz. ($1\ \mu M$), so zeigt sich bei Stopped-Flow-Messungen mit $500\ \mu M\ Zn^{2+}$ außerhalb der Liposomen (\rightarrow 500facher Überschuß) dagegen keine Inhibition (persönliche Mitteilung A. Kannt, 2000).

4. Diskussion

4.1. Vergleich von Strom- und Spannungsmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Strom- und Spannungsmessungen zur Untersuchung von Teilabschnitten des katalytischen Zyklus in *P. denitrificans* COX durchgeführt. Interessante Rückschlüsse kann man hierbei sowohl aus den Zeitkonstanten, als auch aus den Amplituden der Ladungsverschiebungsreaktionen im Molekül ziehen, da es mit ihnen z.B. möglich ist, die Zahl der transportierten Ladungen abzuschätzen. In Übereinstimmung mit den in Kapitel 2.2.3. theoretisch hergeleiteten Zusammenhang zwischen Strom- und Spannungsmessung konnte gezeigt werden, daß die numerische Integration des Stromsignals für den $O \rightarrow E$ Übergang nach Normierung eine mit der Spannungsmessung nahezu identische Kurve liefert. Theoretisch könnten also beide Methoden für die elektrischen Messungen an COX verwendet werden. Hier wurden Spannungsmessungen durchgeführt, da sie unter den gegebenen Bedingungen eine Reihe von Vorteilen besitzen:

- *Bei Spannungsmessungen ist eine höhere Zeitauflösung möglich.*

Das Zeitfenster wird durch zwei Systemzeitkonstanten τ_e und τ_o nach unten bzw. oben bestimmt. Während τ_o sowohl bei Strom- als auch Spannungsmessungen in der Größenordnung 250-500 ms liegt, wird τ_e bei Strommessungen überwiegend durch den Zugriffswiderstand bestimmt und beträgt unter optimierten Bedingungen (Platin-Elektroden direkt in der Küvette, 50 mM Hepes/KOH pH 7.4) bis zu 20 μ s. Spannungsmessungen werden durch die Meßelektronik limitiert und τ_e liegt hier bei etwa 1 μ s.

- *Spannungsmessungen zeigen ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis.*

Strommessungen mit der eben erwähnten hohen Zeitauflösung von 20 μ s führen zu einem Rauschen von mehreren hundert pA, und für eine akzeptable Signalanalyse sind dementsprechend große Signale von einigen nA erforderlich. Das Signal/Rausch-Verhältnis kann durch Mitteln mehrerer Signale verbessert werden. Problematisch hierbei ist allerdings, daß mit zunehmender Blitzanzahl auch die Wahrscheinlichkeit steigt, daß ein Oxidase-Molekül ein weiteres Elektron vom lichtinduzierbaren Elektronendonator Rubpy erhält. Man erzeugt somit ein Gemisch unterschiedlich stark reduzierter Proteine, was wiederum die Meßergebnisse verfälschen kann.

- *Spannungssignale sind besser auswertbar.*

Wie eben erwähnt, zeigen Stromsignale im Gegensatz zu Spannungssignalen unter den gewählten Bedingungen ein sehr großes Rauschen. Langsame Phasen verschwinden somit leicht im Rauschen und sind – wenn überhaupt – nur schlecht zu erfassen. Erschwerend kommt hinzu, daß die apparenten Amplituden bei Strommessungen bei langsam verlaufenden Prozessen abnehmen.

- *Die relativen Amplituden α können bei Spannungsmessungen direkt bestimmt werden.*

Über die relativen Amplituden ist es möglich, Aussagen über die Zahl der transportierten Ladungen zu gewinnen und somit abzuschätzen, wieviele Protonen mit jedem Elektron aufgenommen bzw. gepumpt werden. Bei Spannungsmessungen können die relativen Amplituden direkt aus den apparenten Amplituden der Fitfunktion bestimmt werden, bei Strommessungen benötigt man hierfür das Produkt aus apparater Amplitude und Zeitkonstante. Da aber wie oben beschrieben die langsamen Phasen bei Strommessungen nur schlecht erfaßt werden können, erhält man ungenauere relative Amplituden.

- *Bei gleichbleibendem Bedeckungsgrad des Bilayers mit Liposomen ist das Spannungssignal unabhängig von der Membrangröße.*

Ein wichtiger Unterschied zur Spannungsmessung ist die Abhängigkeit der Stromamplituden von der Größe der Membran und ihrer spezifischen Kapazität. Starke Stromsignale erfordern die sehr schwierige Herstellung großflächiger Filme hoher spezifischer Kapazität, was nur auf Kosten ihrer Lebensdauer erfolgen kann. Kurzlebige Membranen bedeuten jedoch Verdruß, Materialverlust und geringe Chance für mehrere Experimente an einer einzigen Stützmembran.

Spannungsmessungen besitzen gegenüber Strommessungen aber auch einige Nachteile:

- *Stationäres Verhalten kann nicht untersucht werden.*

Während die Zugabe von Entkopplern bei Strommessungen das Erfassen von stationären Strömen ermöglicht, ist eine Spannungsmessungen in Gegenwart von Entkopplern unmöglich.

- *Güte der Membran kann nur optisch überprüft werden.*

Bei Strommessungen ist neben der optischen Kontrolle auch die Überprüfung der Membrangüte mittels Kapazitäts- und Leitfähigkeitsmessung möglich. Aus diesem Grund wurde im verwendeten Bilayeraufbau die Möglichkeit geschaffen, zwischen Strom- und Spannungsmessungen hin und her zu schalten, um so beide Meßverfahren an derselben Membran zu ermöglichen.

4.2. Der O → E Übergang

4.2.1. Zuordnung der einzelnen Phasen im Spannungssignal

Bei der Einelektronenreduktion des vollständig oxidierten Zustandes konnte ein Anstieg der Photospannung gemessen werden, der in 2 Phasen verläuft: einer schnellen mit einer Zeitkonstante von $\tau_1 \approx 20 \mu\text{s}$ und einer relativen Amplitude von $\alpha_1 \approx 0.57$ und einer langsamen mit $\tau_2 \approx 175 \mu\text{s}$ und $\alpha_2 \approx 0.43$.

Die schnelle Phase τ_1 zeigt keinen kinetischen Deuterium-Isotopeneffekt und kann nicht durch CN^- , das am binuklearen Zentrum bindet, inhibiert werden. Die zeitaufgelösten spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß Häm *a* mit $\tau = 30 \mu\text{s}$ oder schneller reduziert wird. Die schnelle Phase kann deshalb dem Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a* zugeordnet werden, in Übereinstimmung mit (Konstantinov et al., 1997), die eine $15 \mu\text{s}$ -Phase für die Reduktion von Häm *a* durch Cu_A während des F → O Übergangs bei *Rb. sphaeroides* fanden. Die zweite Phase τ_2 wird in D_2O um den Faktor 2-3 verlangsamt. Dies liegt im typischen Bereich eines kinetischen Deuterium-Isotopeneffektes (Hallén et al., 1994), was eine Beteiligung von Protonen wahrscheinlich macht. Zugabe von 2 mM KCN inhibiert die langsame Reaktion sowohl in H_2O als auch in D_2O vollständig. Aus diesem Grund ist diese Phase vermutlich mit Vorgängen am binuklearen Zentrum verknüpft. In Einklang mit den Messungen an Mutanten, bei denen bei einer Blockierung des K-Weges (K354M) τ_2 deutlich erhöht wird und die langsame Phase eine kleinere relative Amplitude als beim WT aufweist, lassen die Ergebnisse vermuten, daß es sich bei diesem Prozeß um eine Protonenaufnahme von der intrazellulären Seite über den K-Weg handelt.

(Siletsky et al., 1999) führten kürzlich ähnliche Experimente an Rinderherz-Oxidase durch und berichteten, daß der O → E Übergang nicht mit KCN-sensitiven elektrogenen Protonentransferschritten verknüpft ist, sondern nur mit der KCN-insensitiven μs -Phase τ_1 , dem Elektronentransfer $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$. Sie beobachteten zwar auch eine zusätzliche langsame Phase im ms-Bereich, interpretierten diese aber als Protonentransferschritte in einer kleinen Population an COX, die zu Beginn im P oder F-Zustand vorliegt. Nach dieser Interpretation wäre die langsame Phase τ_2 nur das Ergebnis endogener Reduktionsmittel in den Phospholipiden (Zaslavsky et al., 1995), die eine variable Fraktion an F und P-Zuständen generieren. Diese Interpretation kann für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente eindeutig ausgeschlossen werden, da unter anaeroben Bedingungen gearbeitet (mit Sauerstoffelektrode überprüft), Katalase zugegeben und das Enzym durch Ferricyanid-Zufuhr vollständig in den oxidierten Zustand überführt wurde (durch Absorptionsspektroskopie bestätigt). Aus diesem Grund wei-

sen die vorgestellten Ergebnisse eindeutig auf eine Protonenaufnahme während des O \rightarrow E Übergangs hin. Dies wurde kürzlich durch 2 weitere Gruppen zumindest für das *Paracoccus*-Enzym bestätigt (Wikström et al., 2000; Konstantinov, pers. Mitteilung). Hier schließt sich die Frage an, ob sich bakterielle und Rinderherz-COX eventuell in ihrem Mechanismus unterscheiden. Im Laufe dieser Diskussion wird noch mehrmals darauf eingegangen werden.

4.2.2. Die Rolle der Protoneneintrittspfade K und D

Kürzlich wurde vorgeschlagen, daß über den D-Weg Protonen schneller aufgenommen werden können als über den K-Weg, da ersterer von einer „protonensammelnden Antenne“ umgeben ist (Karpefors et al., 1998a; Marantz et al., 1998). Diese bewirkt, daß der D-Weg schnell Protonen aufnehmen kann, wohingegen die Protonenaufnahme über den K-Weg einen langen, kontinuierlichen Prozeß darstellt (Sacks et al., 1998). Folglich wurde vermutet, daß der Transport des 1. Protons über den D-Weg erfolgt (Michel, 1998).

In Kapitel 3.1.6. konnte gezeigt werden, daß sich Oxidase-Moleküle, bei denen durch gezielte Mutagenese der D-Weg inhibiert wurde (D124N, E278Q), beim O \rightarrow E Übergang kinetisch und elektrisch wie der WT verhalten, der D-Weg bei diesem Reaktionsschritt folglich keine Rolle zu spielen scheint. Blockiert man dagegen den K-Weg durch Austausch der stark konservierten Aminosäure Lys-354 mit Met, so wird die 2. Phase stark verlangsamt ($\tau_2 \approx 900 \mu\text{s}$) und die relative Amplitude verringert sich auf $\alpha_2 \approx 0.2$. Dies deutet darauf hin, daß im WT-Enzym eine Protonenaufnahme über den K-Weg stattfindet. Die Schlußfolgerung steht im Einklang mit anderen Publikationen, die die Wichtigkeit des K-Weges für den reduktiven Teil des katalytischen Zyklus herausstellen (Ädelroth et al., 1998; Vygodina et al., 1998). In dieser Arbeit konnte nun aber zum ersten Mal gezeigt werden, daß eine Beteiligung des K-Weges an die Aufnahme des 1. Elektrons geknüpft ist.

K354M besitzt praktisch keine Aktivität mehr (Pfitzner et al., 1998). Es stellt sich daher die Frage, warum die Protonenaufnahme nicht vollständig blockiert ist, sondern trotzdem verlangsamt und mit kleinerer relativer Amplitude beobachtet werden kann. Eine Möglichkeit wäre, daß in dieser Mutante mit dem ersten Elektron netto kein Proton aufgenommen wird, sondern eine Reorganisation von Ladungen im K-Weg stattfindet (Wikström et al., 2000). Dem steht gegenüber, daß die Doppelmutante D124N/K354M, bei der beide Protoneneintrittspfade blockiert sind, keine langsame Phase mehr zeigt. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß bei „verschlossenem“ K-Weg eventuell zur Kompensation des 1. Elektrons alternativ der D-Weg verwendet werden kann, allerdings nur partiell und langsam.

4.2.3. Welcher Prozeß bewirkt die Aufnahme des Protons?

Mit den hier vorgestellten elektrischen Messungen konnte gezeigt werden, daß beim *Paracoccus*-Enzym während des $O \rightarrow E$ Übergangs eine Protonenaufnahme stattfindet. Hieran schließt sich die Frage an, welcher Prozeß diese Aufnahme bewirkt, der Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a* oder die darauf folgende Reduktion des binuklearen Zentrums.

In der Literatur existieren eine ganze Reihe von Hinweisen, daß bei Einelektronenreduktion des oxidierten Zustands das Elektron in Rinderherz-Oxidase nur bis zum Häm *a*, nicht aber zum katalytischen Zentrum gelangt. So konnten (Fabian et al., 1987) durch schnelles Mischen eines zweifachen Überschusses COX mit Ferrocycytochrom *c* in einer Stopped-Flow-Apparatur unter aeroben Bedingungen zeigen, daß wahrscheinlich zunächst Häm *a* und Cu_A reduziert vorliegen müssen, bevor interner Elektronentransfer zum katalytischen Zentrum stattfinden kann. Auch bei der Reduktion von COX durch das 1-Methylnicotinamid (MNA) Radikal bei Puls-Radiolyse Experimenten wurde das Absorptionsverhalten bei 445 und 605 nm mit der Reduktion von Häm *a* nicht aber von Häm *a*₃ erklärt (Kobayashi et al., 1989). Weiterhin wurden entsprechende Ergebnisse durch Reduktion von COX mittels Rubpy (Nilsson, 1992) erhalten. Aber auch beim bakteriellen Enzym konnte mit Cyt *c*, das kovalent mit einem Rutheniumkomplex verknüpft war, gezeigt werden, daß das aufgenommene Elektron nicht zum binuklearen Zentrum transportiert wird, sondern nur bis zum Häm *a* (Wang et al., 1999). Die in dieser Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten spektroskopischen Untersuchungen der Häm *a* Reduktion am *Paracoccus*-Enzym deuten ebenfalls darauf hin, daß das aufgenommene Elektron im betrachteten Zeitfenster (5 ms) auf Häm *a* verbleibt. Die bei den elektrischen Messungen nachgewiesene Protonenaufnahme scheint also an den Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a* gekoppelt zu sein. Dies steht auch in Einklang mit elektrostatischen Berechnungen (Kannt, Lancaster, Michel, unveröffentlicht).

Auf der anderen Seite behaupten (Wikström et al., 2000), daß das Elektron nicht vollständig auf Häm *a* verbleibt, sondern zu 44% zum binuklearen Zentrum weitertransportiert werden. Sie belegen dies mit einem Differenzspektrum (einelektronenreduziert minus oxidiert) 1 ms nach Rubpy-Photoreduktion. Von diesem wurde das Differenzspektrum reduziertes minus oxidiertes Häm *a* subtrahiert und ein Spektrum mit zwei kleinen Banden bei 598 und 605 nm erhalten. Hieraus schlußfolgern die Autoren, daß die bei den elektrischen Messungen erhaltene 175 µs-Phase das Ergebnis von Protonenaufnahme ist, die an die partielle Reduktion des binuklearen Zentrums geknüpft ist und nicht an den Elektronentransfer $Cu_A \rightarrow$ Häm *a* (Abb. 4.1. (A)). Sie argumentieren weiter, daß diese Interpretation auch erklärt, warum in

Gegenwart von CN^- die zweite elektrometrische Phase inhibiert wird, da nämlich das Elektron nicht mehr zum katalytischen Zentrum fließen kann und somit kein Proton aufgenommen wird.

Tatsache aber ist, daß man mit der spektroskopischen Methode nicht unterscheiden kann, ob der Elektronentransfer zum binuklearen Zentrum die Protonenaufnahme nach sich zieht oder umgekehrt. Das erhaltene Ergebnis kann nämlich mindestens genauso gut dadurch erklärt werden, daß aufgrund des Elektroneutralitätsprinzips (Mitchell und Rich, 1994) der Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm a bereits die Aufnahme eines Protons mit einer Zeitkonstanten von etwa $175 \mu\text{s}$ nach sich zieht. Da das Proton über den K-Weg aufgenommen wird und wahrscheinlich das an Cu_B gebundene Hydroxid-Ion protoniert, könnte sich dann zum besseren lokalen Ladungsausgleich ein partieller Elektronenfluß vom Häm a zum katalytischen Zentrum anschließen, der von der Protonenaufnahmegeschwindigkeit bestimmt wird (Abb. 4.1. (B); Verkhovsky et al., 1995).

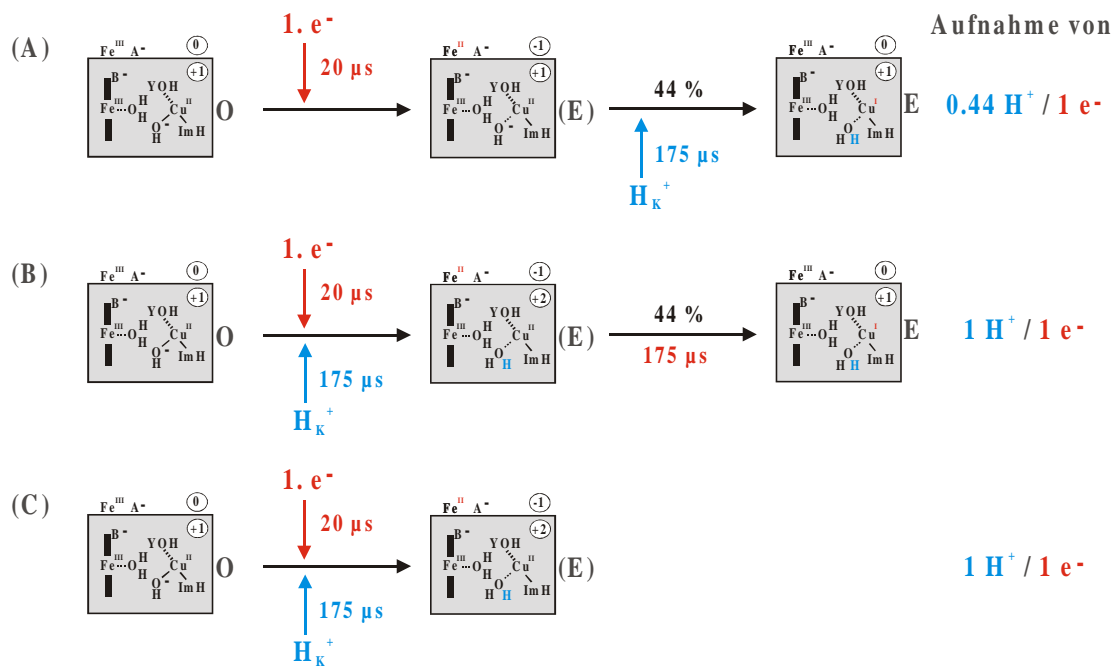


Abb. 4.1. Mögliche Mechanismen der Einelektronenreduktion vollständig oxidierten COX.

Die Abkürzungen sind gemäß Abb. 1.4. bis 1.6. gewählt. E bezeichnet den Zustand, bei dem sich ein Elektron im binuklearen Zentrum befindet. Der einelektronenreduzierte Zustand (E) ist daher kein echter E-Zustand, da sich das Elektron auf Häm a aufhält.

(A) Partielle Elektronenreduktion zum binuklearen Zentrum bewirkt Protonenaufnahme.

(B) $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer bewirkt zur Wahrung der Elektroneutralität die Aufnahme eines Protons. Dies hat partiellen Elektronentransfer zum katalytischen Zentrum zur Folge.

(C) Protonenaufnahme aufgrund des $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfers ohne nachfolgende Reduktion des binuklearen Zentrums.

Auch die Inhibition der Protonenaufnahme durch Cyanid kann anders interpretiert werden. Da dieses in Form von HCN aufgenommen wird (Konstantinov et al., 1986; Panda und Robinson, 1995), entfällt wahrscheinlich die Protonierungsstelle. Zudem wird durch die Cyanid-Bindung vermutlich eine Konformationsänderung ausgelöst (Panda und Robinson, 1995), die ebenfalls die Protonenaufnahme inhibieren könnte.

Warum ist es so wichtig zu wissen, ob nun der Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a* oder eine sich eventuell anschließende Reduktion des binuklearen Zentrums die Protonenaufnahme bewirkt? Dies hat mindestens zwei Gründe: Zum einen ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um einen allgemeingültigen Mechanismus handelt, der auch für die folgenden Elektronentransferschritte im katalytischen Zyklus gilt. Zum anderen hat es einen Einfluß auf die Interpretation der bei den elektrischen Messungen erhaltenen relativen Amplituden. Geht man davon aus, daß nur der Elektronentransfer zum binuklearen Zentrum die Protonenaufnahme bewirkt, so werden beim O → E Übergang gemäß (Wikström et al., 2000) pro Elektron 0.44 Protonen aufgenommen. Mit relativen Amplituden von $\alpha_1 \approx 0.57$ und $\alpha_2 \approx 0.43$ aus den in Kapitel 3.1.5. vorgestellten elektrischen Messungen würde dies eine *rdla* (*relative dielectric location of heme a in the dielectric barrier of the membrane*) von 0.37 bedeuten. Würde dagegen zur Wahrung der Elektroneutralität für jedes zum Häm *a* transportierte Elektron ein Proton aufgenommen, könnte aus den relativen Amplituden eine *rdla* von 0.57 berechnet werden. Bei 0.8 aufgenommenen Protonen (Capitanio et al., 2000) erhält man mit den eben angegebenen Amplituden eine *rdla* von 0.5 (siehe auch Kapitel 4.2.4.). Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben den von der intrazellulären Seite aufgenommenen Protonen auch „interner“ Protonentransfer über einen Bruchteil der dielektrischen Distanz (1-*rdla*) stattfindet

Ein weiterer Punkt, der gegen Wikströms Variante spricht, ist die bei zeitaufgelösten UV/Vis-spektroskopischen Messungen in der vorliegenden Arbeit beobachtete teilweise Reoxidation von Häm *a* (Abb. 3.9.). Diese taucht nämlich scheinbar nur bei häufigem Blitzen auf und ist daher vermutlich auf den Elektronentransfer zum katalytischen Zentrum nach Aufnahme des 2. Elektrons zurückzuführen. Weiterhin sprechen die Ergebnisse von (Capitanio et al., 2000) dafür, daß bei der Reduktion von Häm *a* 0.8 Protonen aufgenommen werden (siehe Kapitel 4.2.4.). Daher favorisieren wir analog (Fabian et al., 1987), daß zunächst Häm *a* und Cu_A reduziert vorliegen müssen, bevor interner Elektronentransfer zum katalytischen Zentrum stattfinden kann. Der zweite Reaktionsschritt in Abb. 4.1., die partielle Reduktion des binuklearen Zentrums, entfällt somit (Abb. 4.1.(C)) und die Protonenaufnahme findet im ersten Schritt statt.

4.2.4. Die relative Position von Häm *a* im Dielektrikum (*rdla*)

Zur Bestimmung der Stöchiometrie von Ladungstranslokationen kann die Amplitude der schnellen Phase τ_1 , die dem Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a* zugeordnet wurde, als interner Standard zur Kalibrierung anderer Phasen im gleichen Signal verwendet werden (Zaslavsky et al., 1993). Hierfür ist allerdings die Kenntnis der *rdla*, also des Weges, den das Elektron bis zum Häm *a* durchs Dielektrikum zurücklegen muß, wichtig.

(Hinkle und Mitchell, 1970) fanden eine Verschiebung des apparenten Häm *a* Mittelpunktspotentials E_m'' bei angelegtem Membranpotential $\Delta\psi$, und zwar

für Valinomycin induzierte K^+ -Diffusionspotentiale: $E_m'' = E_m' - 0.43 \Delta\psi$

für FCCP induzierte H^+ -Diffusionspotentiale: $E_m'' = E_m' - 0.5 \Delta\psi$

mit E_m' = Mittelpunktspotential ohne elektrisches Potential.

Dies wurde so gedeutet, daß ein Elektron von der Außenseite bis zum Häm *a* 50% der dielektrischen Barriere durchqueren muß. Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalysen scheinen mit diesem Ergebnis nicht in Einklang zu stehen, da Häm *a*, Häm *a*₃ und Cu_B deutlich näher an der äußeren als an der inneren Oberfläche lokalisiert sind und zudem die Propionatseitenketten beider Häme nach außen in eine polare Region zeigen, während unterhalb von Häm *a* das Protein recht hydrophob ist.

Da eine geringe pH-Abhängigkeit des Häm *a* Mittelpunktspotentials von 9 mV/pH beobachtet werden konnte (Ellis et al., 1986), was auf die Aufnahme von 0.15 Protonen bei der Reduktion hindeutet, wurde vorgeschlagen, daß die *rdla* von 0.5 bei Protonenaufnahme von innen (Artzbatanov et al., 1978) zu 0.33 (Valinomycin) bzw. 0.43 (FCCP) korrigiert werden müßte (Michel, 1998). Eine *rdla* von 0.33 paßt auch besser zur Struktur und wurde daher von Wikströms Gruppe zur Interpretation ihrer Ergebnisse aus elektrischen Messungen herangezogen (Verkhovsky et al., 1999b).

Capitanio et al. fanden durch Messungen an vollständig reduzierter, CO-inhibierter COX heraus, daß bei Ferricyanid-Oxidation (pH 7.4) 0.8 Protonen pro oxidiertem Cu_A und Häm *a* abgegeben werden. Dieser Prozeß ist komplett reversibel und bei anschließender Rereduktion durch Succinat wird die gleiche Menge an Protonen aufgenommen (Capitanio et al., 1997; 2000). (Verkhovsky et al., 1999a) konnten dagegen bei schrittweiser Oxidation durch Ferricyanid nur die Abgabe von 0.3 Protonen messen. Hierbei wurde allerdings mit substöchiometrischen Mengen Ferricyanid gearbeitet, was nur zu einer unvollständigen Oxidation von Häm *a* und Cu_A und somit geringerer H^+ -Freisetzung führt. Es stellt sich also

die Frage, wie diese große Zahl bei Häm *a* Reduktion/Oxidation aufgenommener/abgegebener Protonen mit der nur kleinen pH-Abhängigkeit des Häm *a* Mittelpunktspotentials (E_m) von 9-20 mV / pH-Einheit (Artzatbanov et al., 1978; Ellis et al., 1986) vereinbar ist. Der Grund dafür ist, daß die E_m -Werte von Häm *a* und Cu_A im pH-Bereich von 6.0 bis 8.5 nahezu identisch sind und **beide** mit 16 mV / pH-Einheit abfallen, wenn der pH erhöht wird. Die E_m -Werte können mit einer Gleichung beschrieben werden, die zwei protolytische Gruppen mit der Oxido-Reduktion von Häm *a* **und** Cu_A verknüpft (Details siehe Capitanio et al., 2000). Demnach ist es tatsächlich möglich, daß trotz der geringen pH-Abhängigkeit des Häm *a* Mittelpunktspotentials 0.8 Protonen bei der Reduktion dieses Kofaktors aufgenommen werden können.

Die Aufnahme von 0.8 Protonen während eines Cu_A → Häm *a* Elektronentransfers liefert mit den in Kapitel 3.1. aus den elektrischen Messungen bestimmten relativen Amplituden $\alpha_1 \approx 0.57$ und $\alpha_2 \approx 0.43$ für den Elektronen- bzw. Protonentransport eine *rdla* von 0.5 in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von (Hinkle und Mitchell, 1970). Die Lokalisierung von Häm *a* und somit auch des katalytischen Zentrums in der Mitte des Dielektrikums erklärt die in dieser Arbeit erhaltenen und sämtliche publizierten Ergebnisse elektrischer Messungen wesentlich besser (siehe folgende Kapitel) als der von Wikströms Gruppe verwendete Wert von 0.33 (Verkhovsky et al., 1999b; Wikström et al., 2000).

4.2.5. Zusammenfassung

Die erhaltenen Daten sprechen dafür, daß sich Häm *a* und das binukleare Zentrum in der Mitte des Dielektrikums befinden. Beim $O \rightarrow E$ Übergang wird bei pH 7.4 ein Elektron vom Cu_A zum Häm *a* mit einer Zeitkonstanten von $\tau_1 \approx 20 \mu s$ transportiert. Dies hat die Aufnahme von vermutlich 0.8 Protonen mit einer Zeitkonstanten von $\tau_2 \approx 175 \mu s$ über den K-Weg zur Folge, die wahrscheinlich die an Cu_B gebundene Hydroxid-Gruppe protonieren. Das Elektron verbleibt möglicherweise auf Häm *a* und wird nicht weiter zum katalytischen Zentrum transportiert. Alternativ wäre auch denkbar, daß beim $Cu_A \rightarrow$ Häm *a* Elektronentransfer 60% des Dielektrikums durchschritten werden müssen und somit 1 Proton von der intrazellulären Seite aufgenommen wird. Da aber gezeigt wurde, daß 0.8 Protonen bei der Reduktion von Häm *a* aufgenommen werden (Capitanio et al., 1997; 2000), ist die erste Variante wahrscheinlicher.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2. nochmals graphisch dargestellt.

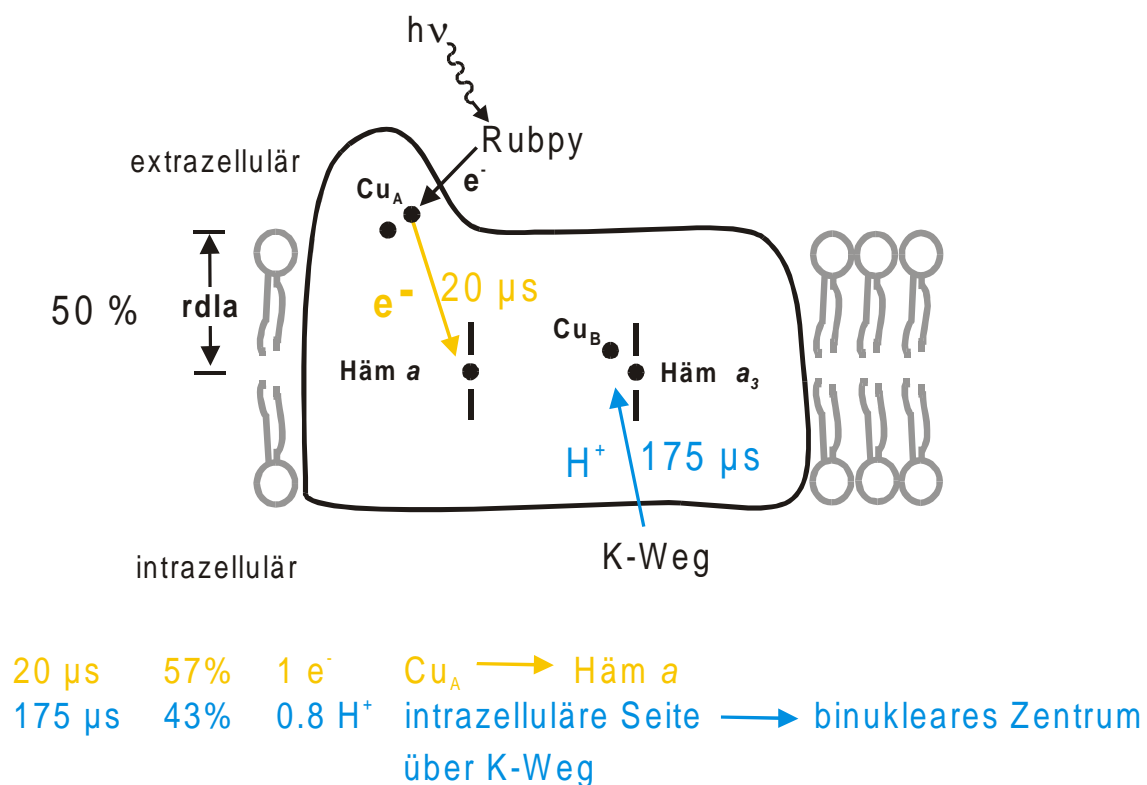


Abb. 4.2. Schematische Darstellung der für den $O \rightarrow E$ Übergang erhaltenen Ergebnisse.

4.3. Der E → R Übergang

4.3.1. Das MV-CO Enzym

Ein Ansatz, um die Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer aufzuklären, besteht darin, den internen Elektronentransfer in verschiedenen Redox- und Protonierungszuständen der Oxidase zu untersuchen. Besonders das Verhalten des MV-CO Enzyms nach Blitzlicht-Photolyse wurde spektroskopisch intensiv an der Rinderherz-COX (z.B. Boelens et al., 1982; Brzezinski und Malmström, 1987; Einarsdóttir, 1995) und am bakteriellen Enzym (Ädelroth et al., 1995) untersucht. Diese Daten können nun genutzt werden, um die in der vorliegenden Arbeit bei elektrischen Messungen beobachteten Phasen zuzuordnen.

Im MV-CO Komplex wird reduziertes Häm a_3 /Cu_B durch die Bindung von CO stabilisiert, während Häm a und Cu_A oxidiert vorliegen. Die Dissoziation von CO nach einem Lichtpuls führt zu einem Abfall des apparenten Reduktionspotentials von Häm a_3 und bewirkt den Elektronenrücktransfer von diesem Kofaktor zum Häm a mit einer Zeitkonstanten von etwa 3 μ s. Da die beiden Häme denselben Abstand zur Membranoberfläche besitzen, ist ein Ladungstransport zwischen diesen beiden Redoxzentren nicht elektrogen und kann nicht als elektrisches Signal beobachtet werden. Das Elektron wird anschließend mit $\tau \approx 35 \mu$ s weiter zum Cu_A transportiert. Die Zeitkonstanten sind für Rinderherz- und *Rhodobacter*-Oxidase identisch (Ädelroth et al., 1995).

In Übereinstimmung mit diesen spektroskopischen Daten konnte bei den elektrischen Messungen im Spannungsabfall eine Phase mit $\tau_1 \approx 27 - 35 \mu$ s gefunden werden, die sich in Einklang mit der Richtung der Spannungsänderung dem Elektronentransfer Häm $a \rightarrow$ Cu_A zuordnen läßt. Zusätzlich tritt aber noch eine weitere Phase τ_2 von etwa 110 μ s auf, die spektroskopisch so nicht beobachtet wird. Blitzt man nur einmal auf das MV-CO Enzym, so tragen beide Phasen etwa gleich zur Signaländerung bei und die Kurve kann oft auch mit nur einer Exponentialfunktion mit $\tau \approx 75 \mu$ s angepaßt werden. Eine Zeitkonstante von 76,7 μ s ist auch von der Gruppe um Einarsdóttir (Einarsdóttir et al., 1995) für den Häm $a \rightarrow$ Cu_A Elektronentransfer durch zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen gefunden worden. Die Tatsache, daß beim Elektronenrückfluß mehr Cu_A reduziert wird als Häm a_3 oxidiert (Brzezinski und Malmström, 1987), deutet darauf hin, daß Elektronen nicht nur vom Häm a_3 sondern alternativ auch vom Cu_B über Häm a zum Cu_A transportiert werden können. Somit ließe sich der beobachtete biphasische Spannungsabfall erklären.

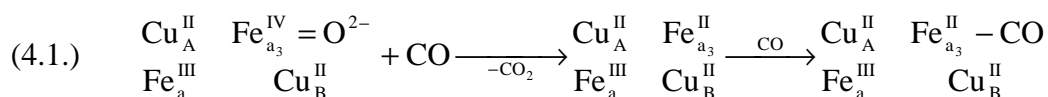
Nach dem Spannungsabfall mit $\tau_1 \approx 27 - 35 \mu$ s und $\tau_2 \approx 110 \mu$ s steigt das elektrische Signal wieder mit 2 Zeitkonstanten $\tau_3 \approx 2.8$ ms und $\tau_4 \approx 30$ ms an und fällt dann mit der Systemzeit

$\tau_4 \approx 400$ ms wieder ab. Bei der 30 ms-Phase handelt es sich wahrscheinlich um die CO-Rückbindung, in Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten ($\tau \approx 25.3$ ms; Georgiadis et al., 1994). τ_3 wird in D₂O um den Faktor 3-4 verlangsamt, was vermuten läßt, daß Protonen hierbei eine Rolle spielen. In der Tat wurde auch bei spektroskopischen Messungen eine ms-Phase gefunden, die einen kinetischen Deuterium Isotopeneffekt von 2-3 besitzt (Hallén et al., 1994). Diese wurde einem Häm $a_3 \rightarrow$ Häm a Elektronentransfer zugeordnet (Ädelroth et al., 1995), dessen Geschwindigkeit durch eine Protonentransferreaktion über den K-Weg bestimmt wird (Ädelroth et al., 1998). Dennoch scheint es sich hierbei nicht um denselben Prozeß zu handeln, da zum einen bei pH 7.4 bei den spektroskopischen Messungen die ms-Phase nahezu überhaupt nicht auftritt (Max. bei pH 9-10) und zum anderen bei einem Protonenaustritt über den K-Weg die Amplitude im elektrischen Signal das umgekehrte Vorzeichen besitzen müßte. Vielmehr könnte es sich bei dem beobachteten Phänomen um eine Protonenabgabe ins externe Medium bei Oxidation von Häm a und/oder eine Protonenaufnahme von der Innenseite bei Rereduktion dieses Redoxzentrums handeln, ähnlich wie dies bei der Oxidation und anschließenden Rereduktion von Häm a beim vollständig reduzierten, CO-vergifteten Enzym beobachtet wurde (Capitanio et al., 1997; Verkhovsky et al., 1999a).

Das MV-CO Enzym, das direkt nach Einelektronenreduktion des E-Zustandes in Gegenwart von CO gebildet wird (Abb. 3.17.), liefert die gleichen Zeitkonstanten wie herkömmlich hergestelltes MV-CO Enzym (Abb. 3.14.). Zusätzlich kann aber nach τ_1 und τ_2 ein weiterer Spannungsabfall mit $\tau \approx 1.5$ ms beobachtet werden. Dies läßt sich damit erklären, daß beim vorangegangenen E \rightarrow R Übergang vermutlich ein Proton von der Innenseite der Liposomen aufgenommen und ein weiteres nach außen gepumpt wurde. Dadurch wird die Innenseite der Liposomen alkalischer und analog den oben erwähnten spektroskopischen Messungen bei hohem pH kann nach anschließender CO-Photolyse eine Protonenabgabe ins Liposomeninnere stattfinden.

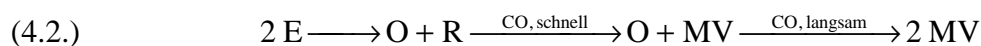
4.3.2. Der einelektronenreduzierte Zustand E

Überführt man WT-COV mit H_2O_2 in den F-Zustand, entfernt anschließend Sauerstoff durch Glucose / Glucose-Oxidase sowie überschüssiges H_2O_2 durch Katalase und begast schließlich mit dem Zweielektronendonator CO, so erhält man ein Differenzspektrum (E minus O) mit einem Minimum bei 414 nm und Maxima bei 443 nm, 520 nm und 608 nm. Dieses unterscheidet sich deutlich von den bekannten Spektren des P- bzw. F-Zustands sowie vom MV-CO bzw. vollreduzierten CO-inhibierten Enzym und deutet darauf hin, daß es sich hierbei um eine andere Spezies handeln muß. Durch Einelektronenreduktion des oxidierten Zustandes mit Hilfe der FIRE-Technik wurde ein sehr ähnliches Differenzspektrum mit Banden bei 414 nm, 444 nm, 520 nm und 606 nm erhalten (Moody et al., 1991). Dies läßt vermuten, daß es sich hierbei tatsächlich um den einelektronenreduzierten Zustand E handelt. Die Bildung des E-Zustandes könnte ausgehend vom F-Zustand gemäß Gleichung 4.1. verlaufen (Witt et al., 1986).



CO scheint hierbei (wenn überhaupt) nur sehr schwach an Häm a_3 gebunden zu sein.

Das beobachtete Differenzspektrum verändert sich in Gegenwart von CO nach einiger Zeit und es entsteht das charakteristische Spektrum des MV-CO Enzyms. Die Geschwindigkeit, mit der der E-Zustand zerfällt und die MV-CO Form gebildet wird, hängt sowohl von der Konzentration der COX als auch von ihrer Beweglichkeit ab. So verschwindet der E-Zustand bei solubilisiertem Enzym schneller als bei rekonstituiertem. Dies ließe sich damit erklären, daß die Oxidase-Moleküle untereinander Elektronen austauschen und somit 2 COX im E-Zustand zu jeweils einem Protein im oxidierten (O) und im zweielektronenreduzierten (R) Zustand disproportionieren können.



R kann sehr schnell CO binden und das MV-CO (MV) Enzym bilden. O wird zunächst gemäß Gleichung 3.1. durch den Zweielektronendonator CO langsam reduziert und kann dann ein weiteres CO-Molekül binden und das Protein in den MV-CO Zustand überführen.

Arbeitet man wie bei den Bilayer-Experimenten mit sehr geringen Oxidase-Konzentrationen (ca. 100 nM in der Küvette), ist die Wahrscheinlichkeit geringer, daß sich 2 COX-Moleküle im E-Zustand treffen und Elektronen austauschen können. Zusätzlich wird durch Adsorption der COV an die BLM die Beweglichkeit der Oxidase-Moleküle verringert. Aus diesem Grund ist die Lebensdauer der E-Form bei den elektrischen Messungen vermutlich bedeutend länger als die für 3 μ M COV bestimmten 10 min.

Mit der D124N-Mutante läßt sich der E-Zustand sogar noch besser einstellen als mit dem WT-Enzym, da der einelektronenreduzierte Zustand scheinbar länger stabil bleibt. Die Ausbeute bei der K354M-Mutante ist dagegen sehr gering.

4.3.3. Einelektronenreduktion des E-Zustandes

Bis vor kurzem war allgemein akzeptiert, daß alle Protonenpumpschritte mit der Sauerstoffreduktion, also den $P \rightarrow F \rightarrow O$ Übergängen verknüpft sind (Wikström, 1989). Nachdem (Michel, 1998) nach Analyse der bis dato veröffentlichten Literatur vorschlug, daß 1 Proton bereits während des $E \rightarrow R$ Übergangs gepumpt wird, lieferte Wikströms Gruppe erste experimentelle Hinweise, daß in Rinderherz-Oxidase eventuell sogar 2 Protonen im reduktiven Teil des katalytischen Zyklus transloziert werden, allerdings während des $O \rightarrow E$ Übergangs und nur, wenn unmittelbar zuvor der oxidative Halbzyklus durchlaufen wurde (Verkhovsky et al., 1999b). Hier nun konnte gezeigt werden, daß während des $E \rightarrow R$ Übergangs vermutlich 1 Proton aufgenommen sowie 1 Proton gepumpt wird, und zwar auch ohne daß vorher der oxidative Teil des katalytischen Zyklus stattfinden muß.

Einelektronenreduktion des Proteins im E-Zustand führt unter CO-Atmosphäre zu einem Spannungssignal, das mit 3 Exponentialfunktionen angepaßt werden kann und Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 27 \mu$ s, $\tau_2 \approx 200 \mu$ s und $\tau_3 \approx 1.5$ ms mit relativen Amplituden $\alpha_1 \approx 0.26$, $\alpha_2 \approx 0.25$ und $\alpha_3 \approx 0.49$ liefert. In Analogie zu den $O \rightarrow E$ bzw. $F \rightarrow O$ Übergängen, zu denen jeweils zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen existieren (Wang et al., 1999), kann die schnelle Phase wiederum dem $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer und die beiden langsamen Phasen Protonenbewegungen zugeordnet werden. Dies steht in Einklang mit den vorgestellten elektrischen Messungen an K- und D-Weg-Mutanten, die auf eine Beteiligung von Protonen bei den langsamen Prozessen hinweisen.

Geht man von einer $rdla = 0.5$ aus (siehe Kapitel 4.2.4.), kann der Elektronentransfer als interner Standard verwendet werden, und die beiden langsamen Phasen lassen sich mit Hilfe ihrer relativen Amplituden als Aufnahme eines Protons von der intrazellulären Seite zur Mitte des Dielektrikums und Pumpen eines weiteren Protons durch das Enzym erklären.

Betrachtet man die Zeitkonstanten und relativen Amplituden, so stellt man fest, daß diese sehr ähnlich den beim $F \rightarrow O$ Übergang beobachteten Parametern sind (siehe Kapitel 3.6.). Da die Präparation des E-Zustandes über den F-Zustand verläuft, stellt sich die Frage, ob man wirklich den $E \rightarrow R$ Übergang beobachtet und nicht etwa den $F \rightarrow O$ Teilschritt des katalytischen Zyklus. Letzteres kann aber aufgrund folgender Beobachtungen ausgeschlossen werden:

Spektroskopische Untersuchungen an rekonstituierten Liposomen zeigen, daß nach CO-Begasung der Oxoferryl-Spezies F sofort und sehr gut quantitativ reproduzierbar der E-Zustand entsteht. Dieser ist für die elektrischen Messungen lange genug stabil. Weiterhin verschwindet im Differenzspektrum E minus O die für den F-Zustand charakteristische breite Bande bei 580 nm, bzw. tritt im Differenzspektrum E minus F ein Minimum bei 580 nm auf. Da in Gegenwart von Katalase gearbeitet wird, würde bei längerer Inkubation zudem der F-Zustand abgebaut (Zaslavsky et al., 1993).

Die Tatsache, daß bei den Mehrfachblitz-Experimenten, ausgehend vom vollständig oxidierten Zustand O, ebenfalls 3 Phasen mit nahezu denselben Zeitkonstanten beobachtet werden konnten, verdeutlicht zum einen, daß es sich hierbei tatsächlich um den $E \rightarrow R$ Übergang handelt und zum anderen, daß für das Protonenpumpen vorher keine oxidative Phase durchlaufen werden muß.

Ein weiterer guter Hinweis darauf, daß hier wirklich der $E \rightarrow R$ Übergang beobachtet wird, sind die Mehrfachblitz-Experimente in Gegenwart von CO, ausgehend vom E-Zustand. Die erhaltenen Meßkurven lassen sich gut mit Gleichung 4.3. mathematisch beschreiben (siehe Abb. 3.17.).

$$(4.3.) \quad y = A * A_E * \sum_E \alpha_E e^{-\frac{t}{\tau_E}} + (1 - A) * A_{MV} * \sum_{MV} \alpha_{MV} e^{-\frac{t}{\tau_{MV}}}$$

A ist hierbei die einzige Variable und beschreibt den Anteil des $E \rightarrow R$ Signals am Gesamtsignal. A_E ist die absolute Amplitude bei reinem $E \rightarrow R$ Übergang (gewonnen aus der Meßkurve nach dem 1. Laserblitz), A_{MV} die absolute Amplitude bei reinem Elektronenrückfluß nach CO-Photodissoziation im MV-CO Enzym (nach vielen Blitzen bleibt

die Signalgröße konstant). Weiterhin gehen die kinetischen Parameter dieser beiden Vorgänge in die Gleichung mit ein. Mit steigender Blitzanzahl erreichen immer mehr COX-Moleküle den zweielektronenreduzierten Zustand R, der CO bindet und somit das MV-CO Enzym bildet. Der Anteil der Elektronenrückfluß-Reaktion am Gesamtsignal wird folglich bei zunehmender Belichtung immer größer.

Ein weiterer wichtiger Hinweis, daß die beobachteten Signale nicht vom $F \rightarrow O$ Übergang herrühren, sind die Ergebnisse der Spannungsmessungen an K- und D-Weg-Mutanten. Während sich beim $F \rightarrow O$ Übergang die K354M-Variante nahezu wie der WT verhält und bei D124N nur der $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer beobachtet werden kann (siehe Kapitel 3.6.2.), tritt hier bei der K354M-Mutante nur die schnelle Phase auf und im D124N-Enzym finden lediglich die ersten beiden Prozesse statt. Dies deutet zum einen wiederum darauf hin, daß es sich hier um den $E \rightarrow R$ Übergang handeln muß und zum anderen, daß bei diesem Teilschritt des katalytischen Zyklus nach Aufnahme des Elektrons ein Proton über den K-Weg aufgenommen wird und ein Proton über den D-Weg gepumpt wird. Daß sowohl K- als auch D-Weg bei diesem Übergang beteiligt sind, läßt sich auch aus den Ergebnissen der vom vollständig oxidierten Zustand ausgehenden Mehrfachblitz-Experimente ableiten.

Die Interpretation steht zudem in Einklang mit Elektronenrückfluß-Messungen beim MV-CO Enzym. Es konnte gezeigt werden, daß dabei ein Protonenaustransport über den K-Weg stattfindet (Ädelroth et al., 1998). Hieraus wurde geschlußfolgert, daß beim Umkehrschritt, der Reduktion des oxidierten binuklearen Zentrums, eine Protonenaufnahme über denselben Weg stattfinden muß. Weiterhin wurde kürzlich demonstriert, daß bei vollständiger Reduktion von COX durch Ruthenium(II)hexammin und Natriumdithionit der D-Weg ebenfalls beteiligt ist (Wikström et al., 2000). Die Ergebnisse verdeutlichen somit, daß der D-Weg bereits für den reduktiven Teil des katalytischen Zyklus notwendig ist, nicht wie bisher angenommen nur für den oxidativen Abschnitt (Konstantinov, 1998).

Die Resultate sind in Abb. 4.3. nochmals graphisch dargestellt.

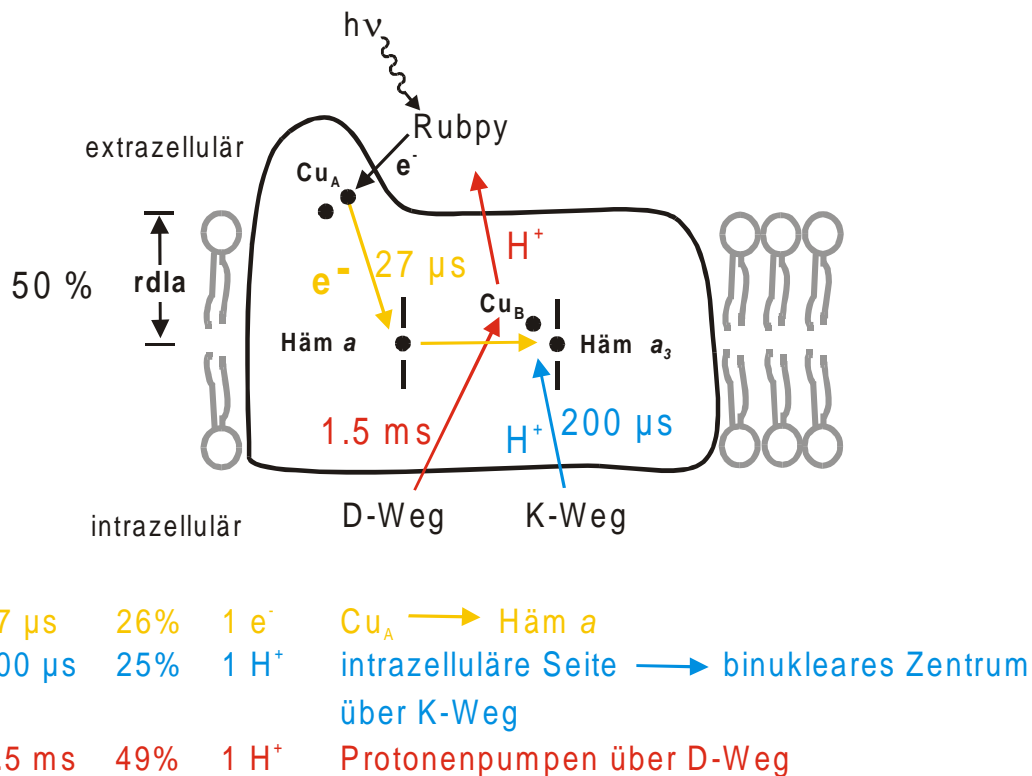


Abb. 4.3. Schematische Darstellung der für den E → R Übergang erhaltenen Ergebnisse.

4.4. Der R → P Übergang; Verwendung von *caged*-Sauerstoff

Viele biologische Reaktionen, bei denen molekularer Sauerstoff involviert ist, sind so schnell, daß Untersuchungen mit konventionellen schnellen Misch-Techniken, wie Stopped-Flow, ungeeignet sind. Eine elegante Methode, Reaktionen wie die Sauerstoffreduktion in der COX zu untersuchen, wäre die Verwendung von *caged*-Sauerstoff. Ein ideales System besitzt eine direkte Sauerstoffquelle und setzt erst nach Belichtung Sauerstoff im relevanten Zeitbereich frei. Die Verbindung oder ihr Photoprodukt sollte weder elektrochemisch noch chemisch mit dem Protein interagieren und auch möglichst nicht mit dem spektralen Bereich des Enzyms interferieren. Wünschenswert sind weiterhin eine hohe Löslichkeit in wäßrigen Lösungen bei physiologischem pH-Wert sowie eine hohe Quantenausbeute.

Zwei potentielle Kandidaten, (μ-superoxo)bis[pentaammincobalt(III)] und (μ-peroxo)(μ-hydroxo)bis[bis(bipyridyl)cobalt(III)] wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und auf diese Kriterien hin untersucht. Der Superoxo-Komplex stellte sich hierbei sehr schnell als ungeeignet heraus, da er zwar eine hohe Quantenausbeute von etwa 30% besitzt, sich aber nur schlecht (< 1mM) in wäßrigen Lösungen bei physiologischem pH-Wert löst. Das Hauptproblem aber ist, daß sich dieser Komplex in Lösung langsam zersetzt und dabei Sauerstoff freisetzt. In Gegenwart von Glucose-Oxidase, das zur Entfernung von restlichem

Sauerstoff zugesetzt wird, zerfällt die Superoxo-Verbindung mit einer Halbwertszeit von etwa 1 min sogar besonders schnell. Der Peroxo-Komplex dagegen hat zwar eine geringere Quantenausbeute (etwa 4%), ist dafür aber besser wasserlöslich und in Lösung relativ stabil, auch in Gegenwart von Glucose-Oxidase oder COX.

Um die Eignung des Peroxo-Komplexes als Sauerstoff-Donor für COX zu überprüfen, wurde die Reaktion des CO-vergifteten MV-CO Enzyms mit Sauerstoff verwendet. Es ist bekannt, daß hierbei keine Protonen aufgenommen werden (Mitchell und Rich, 1994; Oliveberg et al., 1991) und bei sättigenden Sauerstoffkonzentrationen keine elektrogene Reaktion stattfinden sollte (Jasaitis et al., 1999). Bei nichtsättigenden Bedingungen müßte somit nur die für das MV-CO Enzym charakteristische Elektronenrückfluß-Reaktion beobachtet werden.

Führt man allerdings dieses Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peroxo-Verbindung durch, stellt man zum einen fest, daß selbst bei *caged*-Sauerstoff-Konzentrationen von 360 μM noch Elektronenrückfluß beobachtet werden kann (Abfall des Spannungssignals; Abb. 3.22.), was bei einer schwachen Sauerstoffbindung von $K_D \approx 0.3 \text{ mM}$ (Chance et al., 1975; Hill und Greenwood, 1984) und der niedrigen Quantenausbeute von ca. 4% allerdings nicht verwunderlich ist. Zum anderen weicht mit zunehmender $(\mu\text{-peroxo})(\mu\text{-hydroxo})\text{bis}[\text{bis}(\text{bipyridyl})\text{cobalt(III)}]$ -Konzentration das erhaltene elektrische Signal deutlich von dem in Abwesenheit von Sauerstoff bzw. *caged*-Sauerstoff gewonnenen ab (Abb. 3.22.). Die beiden bei fehlendem O_2 im Anstieg beobachteten Zeitkonstanten $\tau_3 \approx 2.8 \text{ ms}$ und $\tau_4 \approx 30 \text{ ms}$, die einer Protonenbewegung und der CO-Rekombination zugeordnet wurden (siehe Kapitel 4.3.1.), werden mit zunehmender *caged*-Sauerstoff Konzentration immer kleiner und erreichen bei 360 μM Peroxo-Verbindung Werte von $\tau_3 \approx 540 \mu\text{s}$ und $\tau_4 \approx 2.6 \text{ ms}$. Wenn wie oben erwähnt die Reaktion von COX mit Sauerstoff nicht elektrogen ist, müßte das Signal durch die Photolyseprodukte der Peroxo-Verbindung bedingt sein. Denkbar wäre, daß aus dem beim Zerfall von *caged*-Sauerstoff gebildeten Kobalt(II)-Komplex (siehe Gleichung 3.3.) eine mononukleare Kobalt(III)-Spezies entstehen kann (Kikkawa et al., 1985). Das hierbei freigesetzte Elektron könnte auf die Oxidase übertragen werden und somit in Gegenwart des ebenfalls freigesetzten Sauerstoffs eine Reaktion der COX über den P-Zustand hinaus bewirken.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die beiden hier untersuchten *caged*-Sauerstoff Verbindungen als O_2 -Donor für COX ungeeignet sind, da sie entweder instabil sind ($(\mu\text{-superoxo})\text{bis}[\text{pentaammincobalt(III)}]$) oder Nebenreaktionen mit dem Protein eingehen ($(\mu\text{-peroxo})(\mu\text{-hydroxo})\text{bis}[\text{bis}(\text{bipyridyl})\text{cobalt(III)}]$).

4.5. Der P → F Übergang

Erste elektrische Messungen der Einelektronenreduktion des P-Zustandes lieferten Signale mit 3 elektrogenen Phasen. Die schnelle Phase mit $\tau_1 \approx 16 \mu\text{s}$ ist KCN-insensitiv und kann analog den anderen untersuchten Übergängen (vergleiche Kapitel 4.2., 4.3., 4.6.) der Reduktion von Häm *a* durch Cu_A zugeordnet werden. Die beiden langsamen Prozesse mit $\tau_2 \approx 90 \mu\text{s}$ und $\tau_3 \approx 630 \mu\text{s}$ lassen sich dagegen vollständig durch Cyanid inhibieren und sind vermutlich mit Protonenbewegungen verknüpft. Wird beim Cu_A → Häm *a* Elektronentransfer eine negative Ladung über die Hälfte der dielektrischen Barriere transportiert, deutet die relative Amplitude von $\alpha_1 \approx 0.2$ für diesen Prozeß darauf hin, daß 80% der Signalgröße auf Protonentransport zurückzuführen sind. Da bereits gezeigt wurde, daß der P → F Übergang mit der Aufnahme eines Protons verknüpft ist (Oliveberg et al., 1991; Karpefors et al., 1998b), verbleiben rechnerisch noch 60% der Signalgröße für Protonenpumpen durch das Enzym, was 1.5 Protonen entspricht.

Bei Spannungsmessungen an der Rinderherz-Oxidase konnten insgesamt sogar 4 Phasen beobachtet werden (Siletsky et al., 1999), wobei die 3 langsamsten KCN-sensitiv waren und Protonenbewegungen zugeordnet wurden. Aus den relativen Amplituden schloß man, daß 2 Protonen pro Elektron transloziert werden bzw. 1 Substratproton aus der Matrix zum binuklearen Zentrum aufgenommen wird und 1.5 Protonen durch das Enzym gepumpt werden, in sehr guter Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen.

Der P-Zustand wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Begasen des MV-CO Enzyms mit Sauerstoff unter Belichten hergestellt (Fabian et al., 1999), wobei der sogenannte P_M-Zustand in über 90%iger Ausbeute entstehen soll. Bei einer ersten spektroskopischen Überprüfung wurden allerdings nur etwa 50% P eingestellt, der Rest des Enzyms befand sich im O-Zustand. Die relativen Amplituden müßten demnach zu Gunsten der langsamen Phasen korrigiert werden, was bedeutet, daß eventuell sogar mehr als die 1.5 Protonen gepumpt werden. Um genauere Aussagen treffen zu können, ist es allerdings notwendig, diesen Übergang noch intensiver zu untersuchen und vor allem die Präparation des P-Zustandes zu optimieren.

Dennoch lassen sich bereits einige interessante Aspekte aus den Messungen ableiten. Zunächst scheinen die Prozesse bei diesem Teilabschnitt des katalytischen Zyklus, insbesondere die Protonenbewegungen, schneller abzulaufen als während der anderen Übergänge. Dies wurde auch von anderen Gruppen bei Messungen am P → F Übergang (Siletsky et al., 1999) oder bei Blitzlicht-Photolyse-Experimenten an vollreduzierter, CO-vergifteter Oxidase in Gegenwart von Sauerstoff (siehe z.B. Ädelroth et al., 1997; Paula et al., 1999) festgestellt. Die Zeitkonstanten sind dabei für bakterielles und mitochondrielles Enzym

nahezu identisch. Interessanterweise fanden (Paula et al., 1999) bei pH 7.5 ebenfalls eine Zeitkonstante von 90 μ s, die mit einer Protonenaufnahme verknüpft ist.

Wie oben bereits erwähnt, deuten die Ergebnisse an, daß eventuell eher 2 Protonen während des $P \rightarrow F$ Übergangs gepumpt werden. Sollte sich dies bewahrheiten, stellt sich die Frage, ob sich bakterielle und mitochondrielle COX in ihrem Mechanismus der Sauerstoffreduktion unterscheiden, da kürzlich postuliert wurde, daß im Rinderherz-Enzym während dieses Abschnitts des katalytischen Zyklus nur 1 Proton gepumpt wird (Verkhovsky et al., 1999b). Auch für andere Teilschritte, z.B. den $O \rightarrow E$ Übergang, gibt es Hinweise, daß sich die beiden Proteine mechanistisch unterscheiden könnten. Auf jeden Fall sind hierfür aber noch intensive Untersuchungen erforderlich, die z. B. die Wiederholung der Experimente von (Verkhovsky et al., 1999b) mit *P. denitrificans* COX und die Aufklärung der verschiedenen P- und F-Zustände beeinhalteten.

4.6. Der $F \rightarrow O$ Übergang

In guter Übereinstimmung mit (Konstantinov et al., 1997), die elektrische Messungen an *Rb. sphaeroides* Oxidase an einem Kollodiumfilm durchgeführt haben, konnten 3 Zeitkonstanten $\tau_1 \approx 26 \mu$ s, $\tau_2 \approx 270 \mu$ s und $\tau_3 \approx 1.5$ ms mit relativen Amplituden von $\alpha_1 \approx 0.30$, $\alpha_2 \approx 0.23$ und $\alpha_3 \approx 0.47$ gefunden werden. Dies zeigt, daß sich die Enzyme aus *Rhodobacter* und *Paracoccus* erwartungsgemäß gleich verhalten und daß die von dieser Gruppe durchgeführten Messungen am Kollodium- bzw. Teflonfilm mit den hier vorgestellten BLM-Experimenten vergleichbar sind.

4.6.1. Zuordnung der einzelnen Phasen im Spannungssignal

Unterstützt durch UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen (Zaslavsky et al., 1998) kann die schnelle Phase dem $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer zugeordnet werden.

Erstaunlicherweise ist die Zeitkonstante für den $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer für alle in dieser Arbeit untersuchten Übergänge ($O \rightarrow E$; $E \rightarrow R$; $P \rightarrow F$; $F \rightarrow O$) mit etwa 20-25 μ s ziemlich gleich. Auch wenn das binukleare Zentrum mit CN^- inhibiert ist, liegt die Zeitkonstante in derselben Größenordnung. Für den Elektronentransport zum Häm *a* scheint es somit gleichgültig zu sein, in welcher Form das Häm *a*₃ vorliegt (Fe^{III} oder $Fe^{IV}=O^{2-}$). Dies ist vielleicht überraschend, da die Zeitkonstante für den Elektronentransfer von Cu_A zum Häm *a* während der Reaktion vollständig reduzierter COX mit Sauerstoff mit etwa 125 μ s deutlich

langsamer ist und durch Protonenaufnahme kontrolliert wird (Ädelroth et al., 1997). Es wurde vorgeschlagen, daß eine elektrostatische Kopplung zwischen Protonenaufnahme am binuklearen Zentrum und Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm a existiert (Hallén und Brzezinski, 1994). Die Zufuhr einer positiven Ladung zum katalytischen Zentrum würde das Redoxpotential von Häm a erhöhen und den $\text{Cu}_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer begünstigen. Die Ergebnisse legen nahe, daß die Nettoladung im binuklearen Zentrum in den von uns hergestellten Zuständen (O, E, P und F) ungefähr gleich ist. Das vollständig reduzierte, CO vergiftete Enzym scheint aber nicht elektrisch ausgeglichen zu sein, da während der Reduktion mit 4 Elektronen nur 2.4 Protonen aufgenommen werden (Mitchell und Rich, 1994). Somit muß bei der eben beschriebenen Reaktion mit Sauerstoff zunächst eine Protonenaufnahme stattfinden, bevor das 4. Elektron vom Cu_A zum Häm a transportiert werden kann.

Die beim $F \rightarrow O$ Übergang von uns im elektrischen Signal beobachteten beiden langsamen Phasen τ_2 und τ_3 verschwinden nach Zugabe von CN^- , das am binuklearen Zentrum bindet und alle Vorgänge dort blockiert, vollständig. Auch eine Punktmutation im D-Weg führt zu demselben Ergebnis (siehe Kapitel 4.6.2.). Diese beiden Phasen scheinen also mit Protonenbewegungen im Enzym verknüpft zu sein und werden analog (Konstantinov et al., 1997) entsprechend zugeordnet. In zeitaufgelösten spektroskopischen Untersuchungen findet man bei bakterieller COX eine Reduktion von Häm a_3 mit einer Zeitkonstanten von 1.4 ms (Zaslavsky et al., 1998). Häm a wird hierbei mit derselben Kinetik reoxidiert. Dies deutet darauf hin, daß während der Reduktion des F-Zustandes kein Intermediat mit reduziertem Cu_B transient angereichert wird. Die hervorragende Übereinstimmung mit der von uns beobachteten langsamsten 3. Phase sowie ein kinetischer Deuterium Isotopeneffekt von 4.3 (Zaslavsky et al., 1998) zeigt, daß die Geschwindigkeit des Elektronentransfers zum Häm a_3 durch die Aufnahme eines Protons kontrolliert wird. Für die bei den elektrischen Messungen gefundene mittelschnelle 2. Phase dagegen existiert kein Pendant in den spektroskopischen Untersuchungen, was darauf hindeutet, daß diese Protonenbewegung keine Änderung im Absorptionsspektrum des Proteins bewirkt.

Mit einer rdla von 0.5 (siehe Kapitel 4.2.4.) lassen sich die beobachteten Ergebnisse und relativen Amplituden wie folgt interpretieren: der Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm a (26 μs) bewirkt die Aufnahme ungefähr eines Protons von der intrazellulären Seite (270 μs). Anschließend wird das Elektron zum Häm a_3 transportiert, wobei die Geschwindigkeit dieses Prozesses durch das Pumpen eines Protons bestimmt wird (1.5 ms).

Die Zeitkonstanten aller drei Phasen sind in der *P. denitrificans* COX zwei- bis dreimal kleiner als im Rinderherz-Enzym (Zaslavsky et al., 1993), in Übereinstimmung mit den

höheren Umsatzraten im bakteriellen Enzym. Die relativen Amplituden der Phasen (ca. 30, 20 und 50%) sind ähnlich, aber nicht identisch mit denen in Rinder-COX (20, 20 und 60%). Dies deutet darauf hin, daß entweder die Ausbeute an F im bakteriellen Enzym geringer ist oder sich bakterielle und Rinderherz-COX in ihrem Mechanismus unterscheiden.

4.6.2. Die Rolle der Protoneneintrittspfade K und D

Blockiert man den D-Weg aufgrund der Mutation D124N, so findet man für den $F \rightarrow O$ Übergang in den elektrischen Messungen nur noch die schnelle Phase. Eine Punktmutation zur Blockierung des K-Weges (K354M) hat bei diesem Teilschritt des katalytischen Zyklus dagegen kaum Einfluß auf die beobachteten Zeitkonstanten. Erstaunlicherweise scheint diese Variante des Enzyms beim $F \rightarrow O$ Übergang sogar aktiver als der WT zu sein, bzw. besser den F-Zustand zu bilden. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Gruppen beobachtet (persönl. Mitteilung A. Konstantinov, M. Verkhovsky). Sowohl die Aufnahme des Substratprotons als auch die des gepumpten Protons erfolgt somit offensichtlich über den D-Weg.

4.6.3. Zusammenfassung

Die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse ist in Abb. 4.4. nochmals schematisch dargestellt.

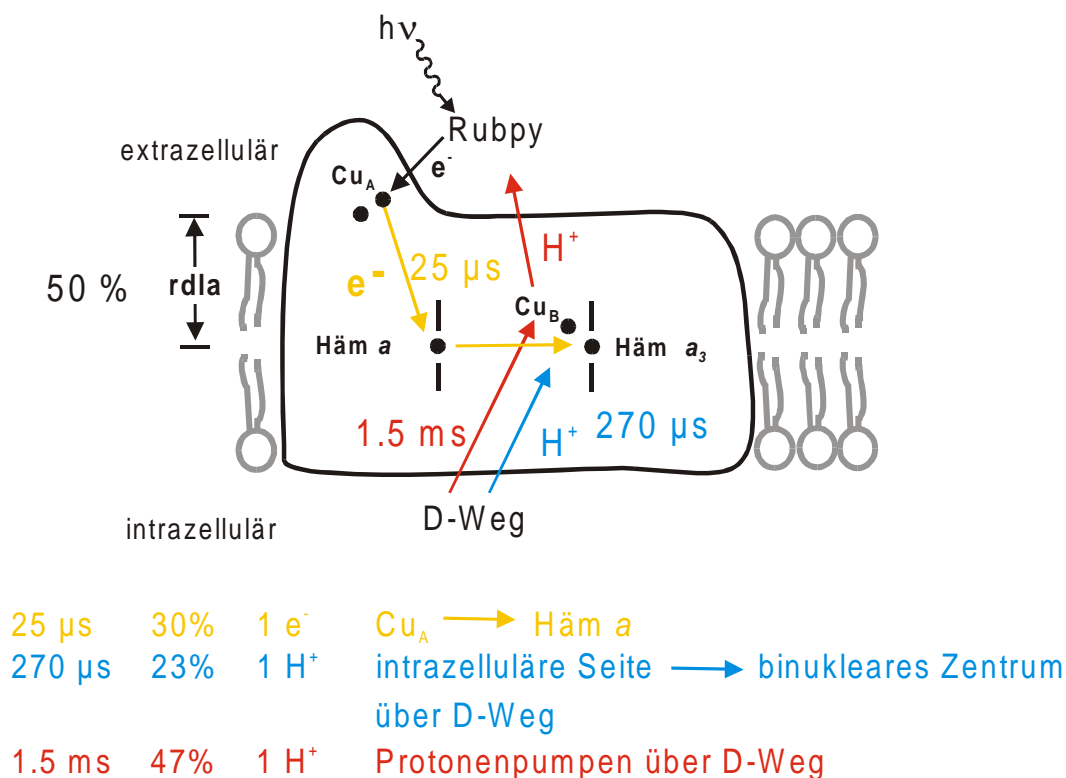


Abb. 4.4. Schematische Darstellung der für den $F \rightarrow O$ Übergang erhaltenen Ergebnisse.

4.7. Neues Modell für den katalytischen Zyklus in *P. denitrificans* COX

Abb. 4.5. faßt die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und publizierte Daten zu einem neuen Modell für den katalytischen Zyklus in *P. denitrificans* COX zusammen. Da noch keine eindeutigen Aussagen darüber gemacht werden können, ob während des $P \rightarrow F$ Übergangs nun 1 oder 2 Protonen gepumpt werden, sind zwei Varianten vorgeschlagen. (A) ist hierbei näher an Michels Mechanismus (Michel, 1998; 1999) angelehnt, (B) dagegen stellt eine Kombination aus Wikströms (Wikström, 2000) und Michels Modell dar.

Der katalytische Zyklus startet mit dem vollständig oxidierten Zustand O. Die zusammenhängende Elektronendichte zwischen dem Häm a_3 Eisen und Cu_B in der *P. denitrificans* Röntgenstruktur (Ostermeier et al., 1997) kann dahingehend interpretiert werden, daß ein H_2O -Molekül am Eisen und ein OH^- am Cu_B gebunden vorliegt. Dies steht in Einklang mit EXAFS und ENDOR Messungen (Fann et al., 1995). Hinweise auf ein H_2O -Molekül als sechstem Liganden des high-spin Häms liefern Messungen am *E. coli* Enzym (Cheesman et al., 1994).

Die Reduktion durch das erste Elektron führt zur Aufnahme eines Protons über den K-Weg (Ruitenbergh et al., 2000). Elektrostatische Berechnungen (Kannt et al., 1998a) zeigen deutlich, daß der OH^- Ligand am Ende des K-Weges der thermodynamisch bevorzugte Akzeptor für das ankommende Proton ist. Das Elektron verbleibt wie in Kapitel 4.2.3. beschrieben vermutlich auf Häm a und wandert nicht weiter ins binukleare Zentrum. Bei diesem Zwischenprodukt handelt es sich somit nicht um einen „echten“ E-Zustand, da sich in E per Definition 1 Elektron im katalytischen Zentrum befindet. Bei der Bezeichnung ist E deshalb in Klammern gesetzt; man könnte diesen Zustand auch arO (O-Zustand mit reduziertem Häm a) nennen.

Injektion des 2. Elektrons führt zur Aufnahme eines weiteren Protons, wahrscheinlich ebenfalls über den K-Weg (siehe Kapitel 4.3.3.). Als Protonenakzeptor im K-Weg wäre ein Histidin Ligand des Cu_B , eventuell His-326, denkbar. Dieser ist beim reduziertem binuklearen Zentrum nur schwach gebunden (Osborne et al., 1999; Ralle et al., 1999) und könnte nach Dissoziation das Proton zu der Protonenakzeptorstelle A^- um die Häm a Propionate befördern. Es existiert eine Barriere für die Rückkehr des Histidin zum Cu_B , so daß das dissoziierte Histidin eine ausreichend lange Lebenszeit besitzt (Wikström, 2000). Die Dissoziation des Histidins könnte zu einer Öffnung des D-Weges führen, so daß beim Transfer des Elektrons vom Häm a zum Häm a_3 ein Proton über den D-Weg zu einem protonierbaren Cluster B^- in der Nähe des katalytischen Zentrums aufgenommen und durch elektrostatische Abstoßung das in AH befindliche Proton auf die extrazelluläre Seite verdrängt und somit gepumpt wird (siehe Kapitel 4.3.3.).

Als nächstes kann molekularer Sauerstoff an das reduzierte katalytische Zentrum binden, und Spezies A wird gebildet (Chance et al., 1975). Es findet eine elektronische Umordnung innerhalb des binuklearen Zentrums statt, woraus der P_M -Zustand resultiert. Ursprünglich wurde vermutet, daß hierbei ein Peroxid oder Hydroperoxid gebunden ist (Wikström, 1987), daher die Bezeichnung „P“[•]. (Weng und Baker, 1991) waren die ersten, die eine Oxoferryl-Struktur mit einem am Cu_B gebundenen OH^- postulierten, und es konnte später durch Resonanz-Raman-Spektroskopie (Proshlyakov et al., 1996; 1998) und Massenspektrometrie (Fabian et al., 1999) bestätigt werden, daß hier die O-O Bindung tatsächlich schon gespalten ist.

Für die reduktive Spaltung von O_2 werden 4 Elektronen benötigt, von denen aber nur 3 (2 Elektronen von $Fe(II) \rightarrow Fe(IV)$, 1 Elektron von $Cu(I) \rightarrow Cu(II)$) von den Metallzentren zur Verfügung gestellt werden. Es konnte durch EPR-Spektroskopie gezeigt werden, daß bei der Reaktion von *P. denitrificans* COX mit H_2O_2 ein Tyrosin-Radikal entsteht (MacMillan et al., 1999), das kürzlich als das mit dem Cu_B -Liganden His-276 quervernetzte Tyr280 identifiziert wurde (Proshlyakov et al., 2000). Dieses Tyrosin liefert also das fehlende Elektron. Auf diese Weise wird der Sauerstoff schnell reduziert und das Auftreten cytotoxischer, teilreduzierter Sauerstoffspezies vermieden.

Bis zu diesem Zeitpunkt sind die beiden in Abb. 4.5. vorgeschlagenen Modelle identisch, unterscheiden sich aber im Folgenden, je nachdem, ob der Transfer des 3. Elektrons vom Cyt *c* zum binuklearen Zentrum nun mit der Translokation von 1 (Abb. 4.5. (B)) oder 2 Protonen (Abb. 4.5. (A)) verknüpft ist. Im ersten Fall wird mit Aufnahme des 3. Elektrons ein Proton zum binuklearen Zentrum aufgenommen, das Tyrosin-Radikal re-reduziert und somit das P_R -Intermediat gebildet. Im 2. Fall wird nach dem $Cu_A \rightarrow Häm\ a$ Elektronentransfer zunächst zur Wahrung der Elektroneutralität ein Proton zu den Häm *a* Propionaten aufgenommen. Der anschließende Transfer des Elektrons zum Tyrosin-Radikal bewirkt die Aufnahme eines weiteren Protons, das das Tyrosinat neutralisiert und das Proton in AH zur extrazellulären Seite elektrostatisch verdrängt. Anschließend wird in beiden Fällen ein Proton zur Protonierung des an Cu_B gebundenen OH^- aufgenommen und dadurch das Proton in BH nach außen verschoben.

(Michel, 1999) schlug vor, daß der P_M -Zustand spontan in eine F-ähnliche Spezies F^\bullet übergeht und daß dieser Vorgang mit dem Pumpen eines Protons verknüpft ist. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da das P_M -Intermediat für seine Stabilität bekannt ist. Weiterhin wird der F^\bullet -Zustand relativ langsam gebildet (Jünemann et al., 2000), zu langsam, um ein Zwischenprodukt des katalytischen Zyklus darzustellen.

(A)

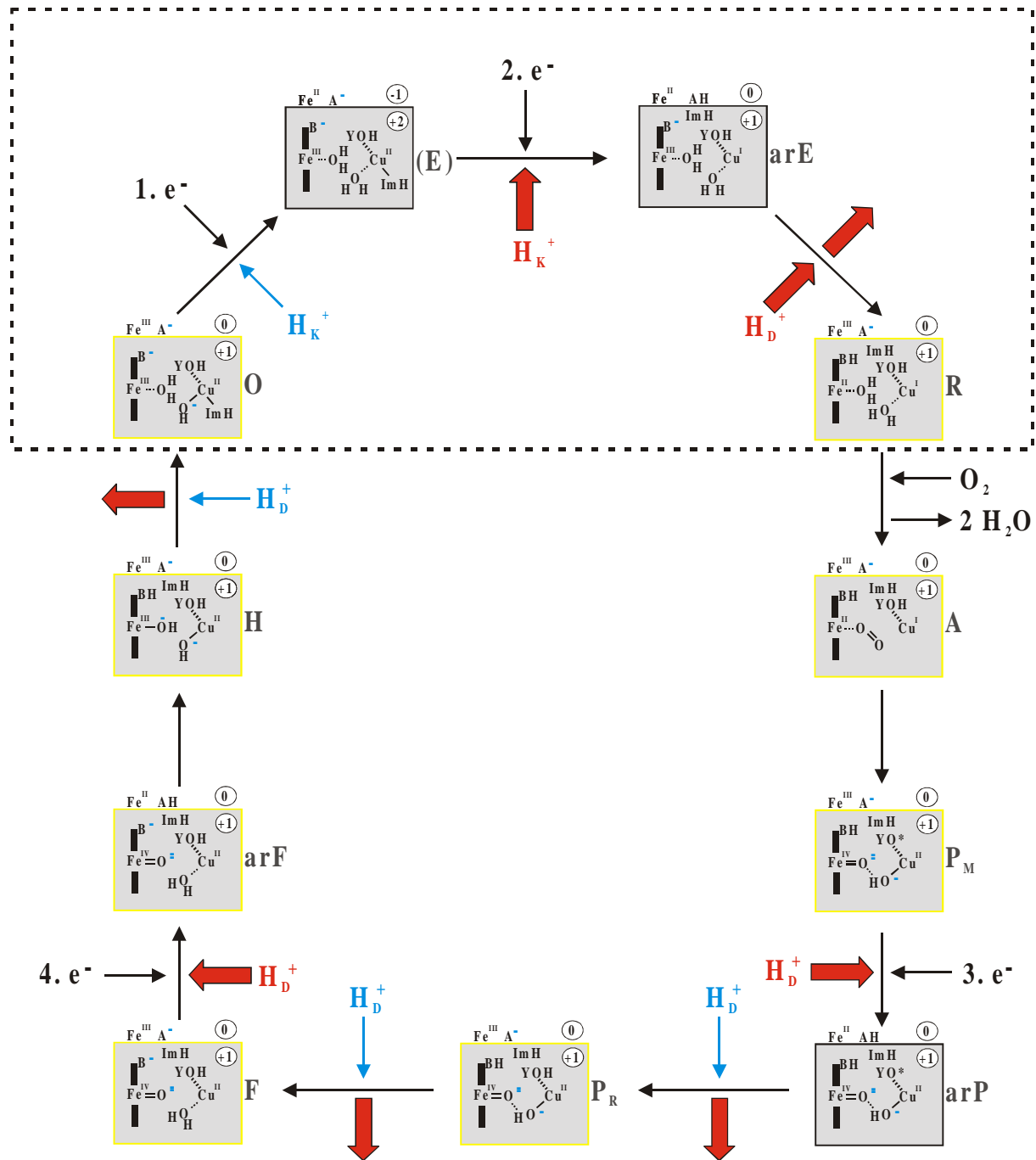
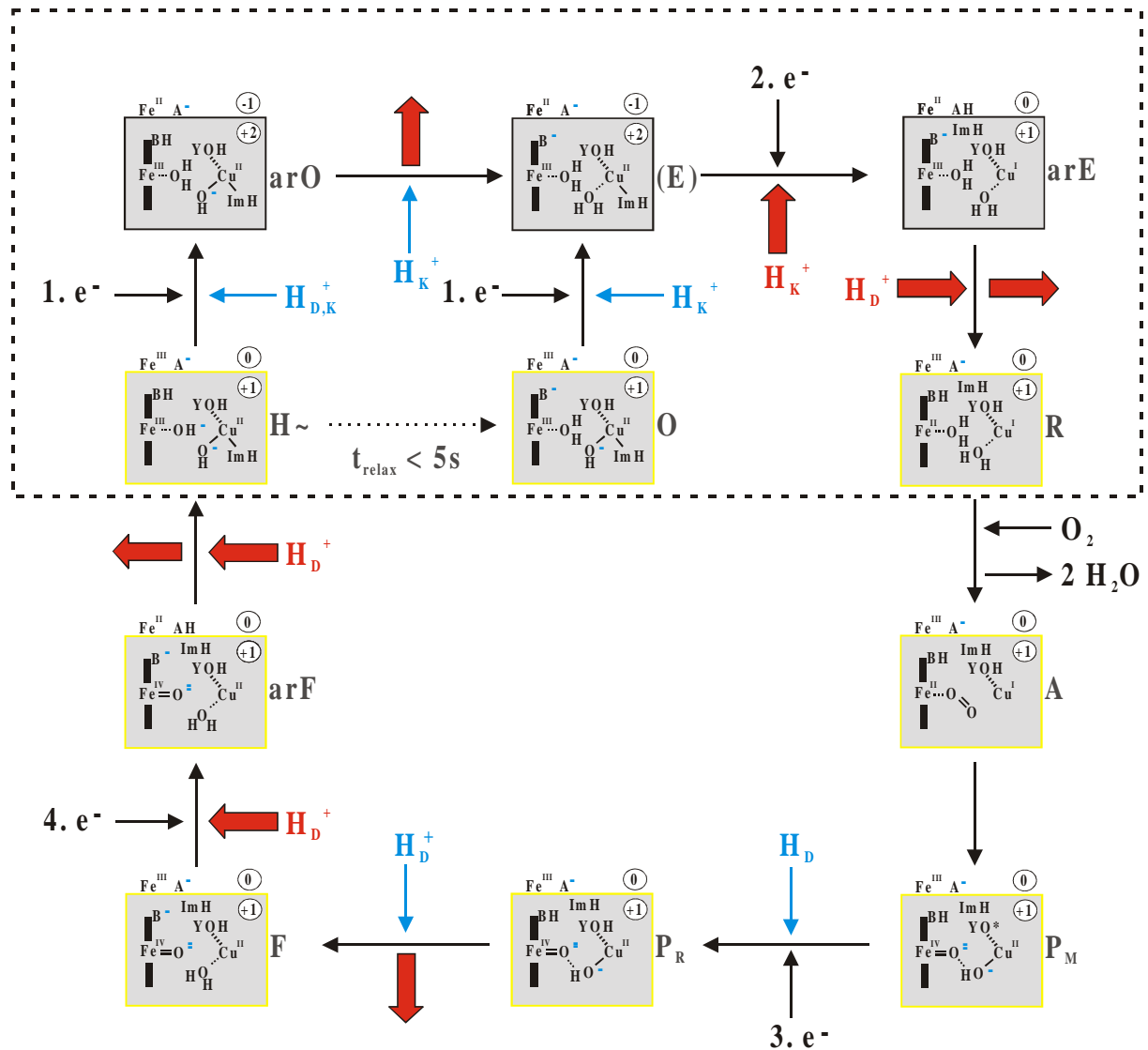


Abb. 4.5. Mögliche Mechanismen der Sauerstoffreduktion in *P. denitrificans*.

In den Boxen sind jeweils Häm a_3 und Cu_B sowie ein Histidin (ImH), wahrscheinlich His-326, dargestellt. B⁻ steht für ein protonierbares Cluster in der Nähe des katalytischen Zentrums. Die Zahl in der rechten oberen Ecke gibt die Nettoladung der beteiligten Komponenten (einschließlich B⁻) an. Für eine bessere Vergleichbarkeit symbolisieren gelbumrandete Kästchen Zustände, die in ihrer Struktur identisch sind mit denen in Michels Modell (siehe Abb. 1.5.). Oberhalb der Box sind jeweils das Häm α Eisen mit seiner formalen Oxidationszahl, A⁻ als Protonenakzeptorstelle um die Häm α -Propionate, sowie die Nettoladung dieser Komponenten (einschließ-

(B)



lich A) dargestellt. Rechts neben den Boxen ist jeweils die Bezeichnung des Zustandes angegeben, wobei ar (z.B. in arE) „Häm *a* reduziert“ bedeutet. e^- steht für Elektronentransfer vom Cu_A zum Häm *a*, H_K^+/H_D^+ für eine Protonenaufnahme über den K-Weg/D-Weg. Substrat-Protonen sind blau hervorgehoben, Rot symbolisiert gepumpte Protonen. Tyr-280 ist kovalent mit His-276, einem Cu_B-Ligand, verbunden (gestrichelte Linie zwischen Cu und YOH), und bildet in manchen Zuständen ein neutrales Radikal YO*. Der mit einer gestrichelten Linie eingefasste obere Bereich wird auch als reduktiver Teil des katalytischen Zyklus bezeichnet, der Rest als oxidativer Teil.

(A) Möglicher Mechanismus, falls 2 Protonen während des P → F Übergangs gepumpt werden.

(B) Möglicher Mechanismus, falls nur 1 Proton während des P → F Übergangs gepumpt wird.

Erläuterungen siehe Text.

Die Struktur des gebildeten Oxoferryl-Zustandes F ist allgemein akzeptiert. Der Unterschied in den optischen Absorptionsspektren der P- im Vergleich zu den F-Zuständen könnte darin begründet liegen, daß ein OH⁻ bzw. H₂O-Ligand am Cu_B gebunden ist (Michel, 1999).

Transfer des 4. Elektrons vom Cu_A zum Häm *a* wird durch eine Protonenaufnahme über den D-Weg begleitet (siehe Kapitel 4.6.) und arF könnte transient gebildet werden. Nach dem Modell in Abb. 4.5. (A) führen der anschließende Elektronentransfer zum Häm *a*₃, interner Protonentransfer von AH nach B⁻, sowie eine Protonen- und Elektronenumordnung im binuklearen Zentrum zur Bildung des H-Zustands, in dem Häm *a*₃ und Cu_B jeweils einen OH⁻-Liganden besitzen. Eine dieser beiden Hydroxid-Gruppen wird über den D-Weg protoniert, was zu einer Verdrängung des Protons in BH auf die extrazelluläre Seite (Pumpen des 4. Protons) und zur Regeneration des O-Zustandes führt. Das Histidin (ImH) bindet wieder am Cu_B, der D-Weg wird dadurch nicht mehr zugänglich und dafür der K-Weg geöffnet. Der Zyklus kann somit von Neuem beginnen.

In Mechanismus (B) wandert das Elektron im arF-Zustand vom Häm *a* zum Häm *a*₃, ein Proton wird über den D-Weg bis zum B⁻ transportiert und gleichzeitig das Proton in AH auf die extrazelluläre Seite verdrängt. Weiterhin findet im katalytischen Zentrum eine Neuorientierung von Protonen und Elektronen statt, so daß der H-Zustand mit jeweils einem Hydroxid-Liganden an Cu_B und Häm *a*₃ entsteht. In Analogie zu (Wikström, 2000) ist dieses Intermediat hier mit H~ bezeichnet. Das Histidin kann nun vermutlich wieder an Cu_B binden, wodurch der D-Weg geschlossen, der K-Weg aber noch nicht geöffnet wird. Diese Öffnung könnte durch die Aufnahme des nächsten Elektrons geschehen. Wird aber nicht innerhalb weniger Sekunden ein Elektron geliefert, können die zwei sich abstoßenden Hydroxid-Liganden nicht protoniert werden und die hochenergetische Spezies H~ lagert spontan zum O-Zustand um. Erhält die Oxidase allerdings ein Elektron, kann ein Proton aufgenommen und somit einer der beiden OH⁻-Liganden protoniert werden (ArO). Die Protonierung der zweiten OH⁻-Gruppe führt zur Verdrängung des Protons in BH und somit zum Pumpen des 4. Protons. Der (E)-Zustand wird gebildet und der Zyklus kann erneut beginnen.

Ein fundamentaler Aspekt beider Mechanismen ist, daß jede Reduktion von Häm *a* die Aufnahme eines Protons bewirkt, also eine Art Elektroneutralitätsprinzip bereits für Häm *a* gilt. Hinweise auf die elektrogene Aufnahme eines Protons während der Häm *a* Reduktion gab es bereits früher (Artzatbanov et al., 1978), wobei die Zahl der Protonen aber mit einem Wert unter 0.5 bestimmt wurde. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, daß tatsächlich nahezu 1 Proton aufgenommen wird, wenn dieser Kofaktor reduziert wird (Capitanio et al.,

2000), in Übereinstimmung mit elektrostatischen Berechnungen an *P. denitrificans* COX (Kannt et al., 1998a; 1998b).

Welcher der beiden vorgeschlagenen Mechanismen richtig ist, kann zum derzeitigen Moment nicht entschieden werden. Erste elektrische Messungen am $P \rightarrow F$ Übergang bei *P. denitrificans* COX scheinen eher auf Modell (A) hinzudeuten (siehe Kapitel 4.5.).

(Verkhovsky et al., 1997) untersuchten die oxidative Phase des katalytischen Zyklus, indem sie die elektrische Ladungstranslokation während der Reaktion vollständig reduzierter, CO-gebundener Rinderherz-Oxidase mit O_2 bestimmten. Hierbei fanden sie nach einer anfänglichen lag-Phase ($R \rightarrow P$) zwei elektrogene Schritte ($P \rightarrow F$ bzw. $F \rightarrow O$) mit identischer Amplitude. Dies deutet auf den ersten Blick eher auf Modell (B) hin, wo bei jenen Übergängen jeweils die gleiche Zahl an Ladungen transportiert wird. Auch die Beobachtung, daß bei Messungen an Liposomen nur 1-2 Protonen (Oliveberg et al., 1991; Verkhovsky et al., 1999b) bei dieser Reaktion ins externe Medium entlassen werden spricht eher für Modell (B). Es herrscht aber nach wie vor Unklarheit darüber, was bei der Reaktion des mit 4 Elektronen und 2.4 (Mitchell und Rich, 1994) bis 3 (Oliveberg et al., 1991) Protonen beladenen, CO-vergifteten Enzyms mit Sauerstoff wirklich passiert. Denkbar wäre nämlich, daß bei der Umsetzung der so vorbeladenen Oxidase mit O_2 ein Protonenpumpschritt entfällt (Zaslavsky und Gennis, 2000).

Um die Zahl der Ladungen zu bestimmen, die während der eben beschriebenen Reaktion über die Vesikelmembran transportiert werden, wurde versucht, die erhaltenen elektrischen Signale zu kalibrieren (Jasaitis et al., 1999). Hierzu wurde die Elektronenrückflußreaktion nach CO-Dissoziation in Abwesenheit von Sauerstoff verwendet. Parallele optische und elektrische Messungen lieferten das Ergebnis, daß hierbei maximal 12% des Cu_A reduziert werden. Bei der entsprechenden Spannungsmessung wurden 0.27 mV gemessen (\rightarrow 100% Reduktion entspricht 2.25 mV). Die absolute Amplitude für die Sauerstoffreaktion betrug 24 mV, also 10.9 mal soviel als bei der Elektronenrückfluß-Reaktion. Mit einer $rdla$ von 0.5 werden somit 5.5 Ladungen während der Sauerstoffreduktion transportiert (mit $rdla = 0.32$ entsprechend 3.5 Ladungen). Schwierig bei diesen Experimenten ist allerdings, exakt dieselben Bedingungen für die spektroskopischen und elektrischen Messungen einzustellen, und es ist relativ unwahrscheinlich, den Reduktionsgrad von Cu_A so genau zu bestimmen. Werden z.B. nur 10% Cu_A beim Elektronenrückfluß reduziert, so könnte eine Zahl von 4.5 (bzw. 2.8) transportierten Ladungen berechnet werden. Diese Kalibrierung ist also sehr ungenau.

(Verkhovsky et al., 1999b) führten Spannungsmessungen durch, bei denen sie vollreduzierte, CO-gebundene Rinderherz-Oxidase mit Sauerstoff reagieren ließen und anschließend sofort mit Ferrocycytochrom *c* wieder vollständig reduzierten. Die oxidative Phase besaß hierbei eine relative Amplitude von 43.7%, die reduktive entsprechend 56.3%. In Verbindung mit pH-Messungen wurden die Ergebnisse so interpretiert, daß 2 Protonen während des O → R Übergangs gepumpt werden, allerdings nur, wenn unmittelbar vorher die oxidative Phase (mit 2 Protonenpumpschritten) durchlaufen wurde. Die Autoren favorisieren hierbei, daß die Translokation beider Protonen während des O → E Übergangs erfolgt. Da aber vollständige Protonenabgabe nach 40%iger Reduktion beider Häme beobachtet wurde, ist ebenfalls möglich, daß 1 Proton während des O → E Übergangs und 1 Proton während des E → R Übergangs transportiert wird. Zusammengekommen deuten die Ergebnisse somit auf Mechanismus (B) hin.

Geht man allerdings davon aus, daß bei der Reaktion vollreduzierter, CO-vergifteter Oxidase mit Sauerstoff ein Protonenpumpschritt entfällt (siehe oben), so werden bei den beschriebenen Experimenten nur 7 statt 8 Ladungen über die Membran transportiert. Mit $rdla = 0.5$ können die erhaltenen relativen Amplituden so erklärt werden, daß während der oxidativen Phase $0.437 \cdot 7 = 3.1$ Ladungen (1 Cu_A → Häm *a* Elektronentransfer, 1 aufgenommenes Proton, 2 gepumpte Protonen) und während der sich anschließenden reduktiven Phase $0.563 \cdot 7 = 3.9$ Ladungen (3 Cu_A → Häm *a* Elektronentransfers, 3 aufgenommene Protonen, 1 gepumptes Proton) bewegt werden. Dies würde also eher auf Mechanismus (A) hindeuten.

Zur Klärung der Fragen, welcher der beiden vorgeschlagenen Mechanismen wahrscheinlicher ist bzw. ob sich mitochondrielle und bakterielle COX gar in ihrem Mechanismus unterscheiden, ist es also u.a. notwendig, den P → F Übergang genauer zu untersuchen und die Experimente von (Verkhovsky et al., 1999b) mit *Paracoccus*-Oxidase zu wiederholen.

4.8. Einfluß von Zn²⁺ auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus

Es konnte gezeigt werden, daß Zn²⁺ im Inneren der Vesikel sowohl den Protonentransfer über den D- als auch über den K-Weg verlangsamt. Eine ähnliche Verzögerung des Protonentransports in Gegenwart von Zn²⁺ wurde auch beim mitochondrialen Cytochrom *bc*₁ Komplex (Link und von Jagow, 1995) und dem bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum (Paddock et al., 1999) beobachtet. Bei letzterem führt die Bindung von Zn²⁺ oder Cd²⁺ zu einer Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten für den zweiten

Elektronentransfer von Q_A nach Q_B . Dieser Elektronentransfer ist an einen Protonentransfer von der cytoplasmatischen Oberfläche zum Q_B gekoppelt. Normalerweise ist der Protonentransport viel schneller als der des Elektrons, in Gegenwart von Zn^{2+} oder Cd^{2+} wird er aber geschwindigkeitsbestimmend.

Zur Bestimmung der genauen Zn^{2+} -Bindestelle(n) wurden 3D-Kristallisationsansätze in Gegenwart des Metallions durchgeführt (Kannt et al., 2001). Unglücklicherweise konnten brauchbare Kristalle nur bei pH 5,5 erhalten werden, eine leichte pH-Erhöhung hatte die Zerstörung der Kristalle zur Folge. In der mit einer Auflösung von 3 Å bestimmten Struktur konnte kein gebundenes Zn^{2+} gefunden werden, da bei diesem pH-Wert die Histidine vermutlich doppelt protoniert vorliegen und somit nicht als Metall-Liganden dienen können. Somit kann über die Lokalisierung der Bindestelle(n) nur spekuliert werden.

Die einfachste Erklärung für den inhibitorischen Effekt von Zn^{2+} auf den Protonentransfer ist die Bindung an Gruppen (wahrscheinlich Histidine und saure Aminosäureseitenketten), die normalerweise als transiente Protonendonatoren bzw. -akzeptoren dienen. In der Nähe des Eingangs zum D-Weg liegen 3 Reste (Asn-27, His-28 und Asp-124), deren Abstand und Geometrie die spezifische Bindung eines Metallions erlauben würde. Hierdurch würde die Protonenaufnahme über Asp-124 blockiert werden. Alternativ könnte Zn^{2+} den Protonentransfer inhibieren, indem es die Anordnung von Wassermolekülen in den Protonenwegen stört oder eintretende Protonen elektrostatisch abstößt.

Behandelt man mit COX rekonstituierte Liposomen mit einem sehr großen Überschuß an $ZnCl_2$ von der Außenseite, so werden sowohl beim $O \rightarrow E$ als auch beim $F \rightarrow O$ Übergang sämtliche Protonenbewegungen inhibiert. Das nicht membrangängige Zink-Dikation ist also offensichtlich auch von außen in der Lage, die Aufnahme von Protonen von der Innenseite zu inhibieren. Zn^{2+} bindet somit eventuell im oder am Protonenaustrittscluster.

Externes Zn^{2+} hat aber nicht nur Einfluß auf die Protonenbewegungen im Enzym. Auch die relative Amplitude der schnellen Phase, also des $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfers, nimmt ab. Zn^{2+} scheint somit mit Rubpy um die Cyt *c* Bindestelle zu konkurrieren.

COX besitzt also offensichtlich auf der Außenseite ebenfalls mindestens eine Zink-Bindestelle. Diese besitzt aber eine geringere Affinität, als die auf der Innenseite, da zur Inhibition von außen größere Mengen des zweiwertigen Metall-Ions nötig sind.

5. Zusammenfassung

Obwohl die Kristallstrukturen der Cytochrom-*c*-Oxidase aus Rinderherz-Mitochondrien und dem Bodenbakterium *P. denitrificans* bekannt sind und die Funktionsweise des Enzyms mit Hilfe zahlreicher Methoden bereits intensiv untersucht wurde, wird nach wie vor kontrovers diskutiert, an welcher Stelle im katalytischen Zyklus wieviele Protonen aufgenommen bzw. gepumpt werden und über welchen der beiden Protoneneintrittspfade dies geschieht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diesen Fragestellungen mit Hilfe von elektrischen Messungen nachzugehen, um dann ein genaueres Bild von der mechanistischen Funktionsweise des Enzyms zu erhalten. Hierzu wurden Teilschritte des katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c*-Oxidase aus *P. denitrificans* genauer untersucht. Dies gelang durch Spannungsmessungen an der schwarzen Lipidmembran mit $\text{Ru}^{\text{II}}(2,2'\text{-bipyridyl})_3\text{Cl}_2$ (Rubpy) als lichtinduzierbarem Einelektronendonator.

Es konnte gezeigt werden, daß ausgehend vom vollständig oxidierten Zustand O nach Lichtanregung ein Elektron von Rubpy auf die Oxidase übertragen und anschließend vom Cu_A zum Häm *a* mit einer Zeitkonstanten von $\approx 20 \mu\text{s}$ transportiert wird. Zeitaufgelöste spektroskopische Messungen deuten darauf hin, daß das Elektron auf dem Häm *a* verbleibt. Die Reduktion dieses Kofaktors führt zu einer Protonenaufnahme über den K-Weg mit einer Zeitkonstanten von $\approx 175 \mu\text{s}$. Nimmt man an, daß sich Häm *a* in der Mitte des Dielektrikums befindet (Hinkle und Mitchell, 1970), so deuten die relativen Amplituden der beiden Phasen an, daß etwa 0.8 Protonen aufgenommen werden, in sehr guter Übereinstimmung mit (Capitanio et al., 2000).

Aus Mehrfachblitz-Experimenten unter anaeroben Bedingungen, ausgehend vom O-Zustand, konnten erste Erkenntnisse über den $\text{E} \rightarrow \text{R}$ Übergang gewonnen werden, nämlich daß hierbei ein Prozeß mit einer Zeitkonstanten von ca. 1.1 ms auftritt und daß sowohl K- als auch D-Weg an diesem Teilschritt des katalytischen Zyklus beteiligt sind. Da mit der Mehrfachblitz-Methode aber immer ein Gemisch aus verschiedenen Zuständen entsteht, war es nicht möglich, quantitative Aussagen über die Zahl der transportierten Ladungen zu treffen. Aus diesem Grund wurde eine Möglichkeit gesucht, den E-Zustand in hoher Ausbeute mit ausreichender Stabilität herzustellen, um dann ein Elektron zu übertragen. Dies gelang durch Darstellung des Oxoferryl-Zustandes F mit Hilfe von H_2O_2 und anschließende Zweielektronenreduktion durch CO. Die Übertragung von einem Elektron auf den so gebildeten E-Zustand lieferte 3 Phasen im Spannungssignal mit Zeitkonstanten von $\approx 25 \mu\text{s}$, $\approx 200 \mu\text{s}$ und $\approx 1.5 \text{ ms}$. Die relativen Amplituden dieser Phasen und die Ergebnisse von K- und D-Weg-Mutanten legen nahe,

daß nach Aufnahme des 2. Elektrons vermutlich ein Proton über den K-Weg aufgenommen und anschließend 1 Proton über den D-Weg gepumpt wird. Es konnte somit zum ersten Mal gezeigt werden, daß bereits während des reduktiven Teils ($O \rightarrow R$) des katalytischen Zyklus ein Proton von der intrazellulären zur extrazellulären Seite transportiert wird und zwar ohne daß unmittelbar vorher die Sauerstoffreduktion stattgefunden haben muß.

Erste Experimente zum $P \rightarrow F$ Übergang lassen sich so deuten, daß mit Aufnahme des 3. Elektrons ein Proton zum binuklearen Zentrum transportiert und mindestens 1, wenn nicht gar 2 Protonen durch das Enzym gepumpt werden. Hier sind noch weitere Experimente nötig, um die genaue Zahl der transportierten Ladungen und die für die einzelnen Protonenbewegungen verwendeten Protoneneintrittspfade zu bestimmen.

Messungen zum $F \rightarrow O$ Übergang schließlich zeigten, daß nach dem $Cu_A \rightarrow \text{Häm } a$ Elektronentransfer mit einer Zeitkonstanten von ca. 25 μs vermutlich 1 Proton über den D-Weg bis zu den Hämen transportiert ($\tau \approx 270 \mu\text{s}$) und anschließend ein Proton ebenfalls über den D-Weg gepumpt wird ($\tau \approx 1.5 \text{ ms}$).

Aus den gewonnenen Daten wurde ein neuer Mechanismus für die Sauerstoffreduktion in der *Paracoccus*-COX entwickelt. Dieser beruht auf dem von Mitchell und Rich postulierten Elektroneutralitätsprinzip (Mitchell und Rich, 1994) und ist stark an das von Michel vorgeschlagene Modell (Michel, 1998; Michel, 1999) angelehnt. Zur Klärung der Fragen, ob sich bakterielles und Rinderz-Enzym eventuell in ihrem Mechanismus unterscheiden oder ob nicht eventuell ein Proton während des $O \rightarrow E$ Übergangs gepumpt wird (allerdings nur, wenn unmittelbar vorher die Sauerstoffreduktion durchlaufen wurde), sind u.a. noch intensivere Untersuchungen des $P \rightarrow F$ Teilschrittes notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin 2 verschiedene Kobaltkomplexe auf ihre Eignung als lichtinduzierbare Sauerstoffdonatoren (*caged*-Sauerstoff) für die COX untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß beide Verbindungen ungeeignet sind, da sie entweder instabil sind ($((\mu\text{-superoxo})\text{bis}[\text{pentaammincobalt(III)}])$) oder Nebenreaktionen mit dem Protein eingehen ($((\mu\text{-peroxo})(\mu\text{-hydroxo})\text{bis}[\text{bis}(\text{bipyridyl})\text{cobalt(III)}])$).

Abschließend wurde der Einfluß von Zn^{2+} -Ionen auf elektrogene Schritte im katalytischen Zyklus genauer erforscht. Es wurde deutlich, daß Zn^{2+} bakterielle COX von beiden Seiten inhibieren kann, wobei die Bindestelle(n) auf der intrazellulären Seite im Gegensatz zur extrazellulären Seite hochaffin ist/sind. Die elektrischen Messungen deuten darauf hin, daß hierbei sowohl D- als auch K-Weg blockiert werden, wobei die exakte Position der Metallbindestelle(n) noch zu klären ist.

6. Literaturverzeichnis

- Ädelroth, P., Brzezinski, P. und Malmström, B. G. (1995). Internal electron transfer in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **34**, 2844-2849.
- Ädelroth, P., Gennis, R. B. und Brzezinski, P. (1998). Role of the pathway through K(I-362) in proton transfer in cytochrome c oxidase from *R. sphaeroides*. *Biochemistry* **37**, 2470-2476.
- Ädelroth, P., Svensson Ek, M., Mitchell, D. M., Gennis, R. B. und Brzezinski, P. (1997). Glutamate 286 in cytochrome aa-3 from *Rhodobacter sphaeroides* is involved in protein uptake during the reaction of the fully-reduced enzyme with dioxygen. *Biochemistry* **36**, 13824-13829.
- Antonini, G., Malatesta, F., Sarti, P. und Brunori, M. (1993). Proton pumping by cytochrome oxidase as studied by time-resolved stopped-flow spectrophotometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5949-5953.
- Artzatbanov, V. Y., Konstantinov, A. A. und Skulachev, V. P. (1978). Involvement of intramitochondrial protons in redox reactions of cytochrome alpha. *FEBS Lett.* **87**, 180-185.
- Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Paddock, M. L., Okamura, M. Y. und Feher, G. (2000). Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd^{2+} and Zn^{2+} in bacterial reaction centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1542-1547.
- Bamberg, E., Apell, H.-J., Dencher, N. A., Sperling, W., Stieve, H. und Läger, P. (1979). Photocurrents generated by bacteriorhodopsin on planar bilayer membranes. *Biophys. Struct. Mechanism* **5**, 277-292.
- Behr, J., Michel, H., Mäntele, W. und Hellwig, P. (2000). Functional properties of the heme propionates in cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Evidence from FTIR difference spectroscopy and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **39**, 1356-1363.
- Berry, E. A., Zhang, Z., Bellamy, H. D. und Huang, L. (2000). Crystallographic location of two Zn^{2+} -binding sites in the avian cytochrome bc(1) complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 440-448.
- Boelens, R., Wever, R. und Van Gelder, B. F. (1982). Electron transfer after flash photolysis of mixed-valence carboxycytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 264-272.

- Borlinghaus, R., Apell, H. J. und Läger, P. (1987).** Fast charge translocations associated with partial reactions of the Na,K-pump: I. Current and voltage transients after photochemical release of ATP. *J. Membr. Biol.* **97**, 161-178.
- Brzezinski, P. und Ädelroth, P. (1998).** Pathways of proton transfer in cytochrome c oxidase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 99-107.
- Brzezinski, P. und Malmström, B. G. (1985).** The reduction of cytochrome c oxidase by carbon monoxide. *FEBS Lett.* **187**, 111-114.
- Brzezinski, P. und Malmström, B. G. (1987).** The mechanism of electron gating in proton pumping cytochrome c oxidase the effect of pH and temperature on internal electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 29-38.
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. und Papa, S. (1997).** Vectorial nature of redox Bohr effects in bovine heart cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **414**, 414-418.
- Capitanio, N., Capitanio, G., Minuto, M., De Nitto, E., Palese, L. L., Nicholls, P. und Papa, S. (2000).** Coupling of electron transfer with proton transfer at heme a and Cu-A (redox Bohr effects) in cytochrome c oxidase. Studies with the carbon monoxide inhibited enzyme. *Biochemistry* **39**, 6373-6379.
- Chance, B., Saronio, C. und Leigh, J. S., Jr. (1975).** Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.* **250**, 9226-9237.
- Cheesman, M. R., Watmough, N. J., Gennis, R. B., Greenwood, C. und Thomson, A. J. (1994).** Magnetic-circular-dichroism studies of Escherichia coli cytochrome bo. Identification of high-spin ferric, low-spin ferric and ferryl [Fe(IV)] forms of heme o. *Eur. J. Biochem.* **219**, 595-602.
- Ebsworth, E. A. V. und Weil, J. A. (1959).** Paramagnetic resonance absorption in peroxo-dicobalt complexes. *J. Phys. Chem.* **63**, 1890.
- Einarsdóttir, O. (1995).** Fast reactions of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 129-147.
- Einarsdóttir, O., Georgiadis, K. E. und Sucheta, A. (1995).** Intramolecular electron transfer and conformational changes in cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **34**, 496-508.
- Ellis, W. R., Jr., Wang, H., Blair, D. F., Gray, H. B. und Chan, S. I. (1986).** Spectroelectrochemical study of the cytochrome a site in carbon monoxide inhibited cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **25**, 161-167.
- Fabian, M. und Palmer, G. (1995).** The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide - the relationship of compounds P and F. *Biochemistry* **34**, 13802-13810.

- Fabian, M., Thörnström, P. E., Brzezinski, P. und Malmström, B. G. (1987).** Two-electron reduction is required for rapid internal electron transfer in resting, pulsed and oxygenated cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **213**, 396-400.
- Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B. und Palmer, G. (1999).** Mass spectrometric determination of dioxygen bond splitting in the "peroxy" intermediate of cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13114-13117.
- Fahr, A., Läuger, P. und Bamberg, E. (1981).** Photocurrent kinetics of purple-membrane sheets bound to planar bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* **60**, 51-62.
- Fann, Y. C., Ahmed, I., Blackburn, N. J., Boswell, J. S., Verkhovskaya, M. L., Hoffman, B. M. und Wikström, M. (1995).** Structure of Cu-B in the binuclear heme-copper center of the cytochrome aa(3)-type quinol oxidase from *Bacillus subtilis* - an ENDOR and EXAFS study. *Biochemistry* **34**, 10245-10255.
- Ferguson, S. J. und Sorgato, M. C. (1982).** Proton electrochemical gradients and energy-transduction processes. *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 185-217.
- Ferguson-Miller, S. und Babcock, G. T. (1996).** Heme/copper terminal oxidases. *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
- Fillingame, R. H. (1997).** Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *J. Exp. Biol.* **200**, 217-224.
- Gennis, R. B. (1998).** Cytochrome c oxidase: one enzyme, two mechanisms? *Science* **280**, 1712-1713.
- Georgiadis, K. E., Jhon, N. I. und Einarsdóttir, O. (1994).** Time-resolved optical absorption studies of intramolecular electron transfer in cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **33**, 9245-9256.
- Geren, L., Hahm, S., Durham, B. und Millett, F. (1991).** Photoinduced electron transfer between cytochrome c peroxidase and yeast cytochrome c labeled at cys 102 with 4 bromomethyl-4'-methylbipyridinebisbipyridineruthenium-II. *Biochemistry* **30**, 9450-9457.
- Gerhus, E., Steinrücke, P. und Ludwig, B. (1990).** *Paracoccus denitrificans* cytochrome c1 gene replacement mutants. *J. Bacteriol.* **172**, 2392-2400.
- Gleu, K. und Rehm, K. (1938).** Zur Konstitution der grünen Peroxo-Kobaltamine. *Z. anorg. Chem.* **237**, 79.
- Greenwood, C., Wilson, M. T. und Brunori, M. (1974).** Studies on partially reduced mammalian cytochrome oxidase. Reactions with carbon monoxide and oxygen. *Biochem. J.* **137**, 205-215.

- Hallén, S. und Brzezinski, P. (1994).** Light-induced structural changes in cytochrome c oxidase: implication for the mechanism of electron and proton gating. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 207-218.
- Hallén, S., Brzezinski, P. und Malmström, B. G. (1994).** Internal electron transfer in cytochrome c oxidase is coupled to the protonation of a group close to the bimetallic site. *Biochemistry* **33**, 1467-1472.
- Hallén, S., Oliveberg, M. und Brzezinski, P. (1993).** Light-induced structural changes in cytochrome c oxidase measurements of electrogenic events and absorbance changes. *FEBS Lett.* **318**, 134-138.
- Han, S., Ching, Y. C. und Rousseau, D. L. (1990).** Ferryl and hydroxy intermediates in the reaction of oxygen with reduced cytochrome c oxidase. *Nature (London)* **348**, 89-90.
- Hill, B. C. und Greenwood, C. (1984).** The reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with oxygen studied by flow-flash spectrophotometry at room temperature. Evidence for new pathways of electron transfer. *Biochem. J.* **218**, 913-921.
- Hinkle, P. und Mitchell, P. (1970).** Effect of membrane potential on equilibrium poise between cytochrome a and cytochrome c in rat liver mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1**, 45-60.
- Hofacker, I. und Schulten, K. (1998).** Oxygen and proton pathways in cytochrome c oxidase. *Proteins* **30**, 100-107.
- Holz, M. (1990).** *Biophysikalische Signalanalyse mit kontinuierlichen Relaxationsspektren*, Verl. für Wiss. u. Bildung, Berlin.
- Hosler, J. P., Shapleigh, J. P., Mitchell, D. M., Kim, Y., Pressler, M. A., Georgiou, C., Babcock, G. T., Alben, J. O., Ferguson-Miller, S. und Gennis, R. B. (1996).** Polar residues in helix Viii of subunit I of cytochrome c oxidase influence the activity and the structure of the active site. *Biochemistry* **35**, 10776-10783.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995).** Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature (London)* **376**, 660-669.
- Jasaitis, A., Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M. L. und Wikström, M. (1999).** Assignment and charge translocation stoichiometries of the major electrogenic phases in the reaction of cytochrome c oxidase with dioxygen. *Biochemistry* **38**, 2697-2706.
- Jünemann, S., Heathcote, P. und Rich, P. R. (2000).** The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1456**, 56-66.

- Jünemann, S., Meunier, B., Gennis, R. B. und Rich, P. R. (1997).** Effects of mutation of the conserved lysine-362 in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **36**, 14456-14464.
- Kannt, A., Lancaster, C. R. und Michel, H. (1998a).** The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Biophys. J.* **74**, 708-721.
- Kannt, A., Lancaster, C. R. D. und Michel, H. (1998b).** The role of electrostatic interactions for cytochrome c oxidase function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 81-87.
- Kannt, A. und Michel, H. (2001).** Bacterial cytochrome c oxidase. In: *Handbook of Metalloproteins* John Wiley, Chichester.
- Kannt, A., Ostermann, T., Müller, H. und Ruitenbergh, M. (2001).** Zn²⁺ binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation. *FEBS Lett.*, submitted.
- Karpefors, M., Ädelroth, P., Aagaard, A., Sigurdson, H., Svensson Ek, M. und Brzezinski, P. (1998a).** Electron-proton interactions in terminal oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 159-169.
- Karpefors, M., Ädelroth, P., Zhen, Y. J., Ferguson-Miller, S. und Brzezinski, P. (1998b).** Proton uptake controls electron transfer in cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13606-13611.
- Kikkawa, M., Sasaki, Y., Kawata, S., Hatakeyama, Y., Ueno, F. B. und Saito, K. (1985).** Photochemical and thermal decomposition of ($\Delta\Delta,\Lambda\Lambda$)-(μ-Hydroxo)(μ-peroxo)bis[bis(ethylenediamine)cobalt(III)] ions in basic aqueous solution. *Inorg. Chem.* **24**, 4096-4100.
- Kleymann, G., Ostermeier, C., Ludwig, B., Skerra, A. und Michel, H. (1995).** Engineered Fv fragments as a tool for the one-step purification of integral multisubunit membrane protein complexes. *Biotechnology* **13**, 155-160.
- Kobayashi, K., Une, H. und Hayashi, K. (1989).** Electron transfer process in cytochrome oxidase after pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* **264**, 7976-7980.
- Konstantinov, A., Vygodina, T. und Andreev, I. M. (1986).** Electrogenic proton exchange between cytochrome a₃ active center and M-aqueous phase. Evidence for cytochrome a₃-associated input proton well. *FEBS Lett.* **202**, 229-234.
- Konstantinov, A. A. (1998).** Cytochrome c oxidase as a proton-pumping peroxidase: Reaction cycle and electrogenic mechanism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 121-130.

- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A. und Gennis, R. B. (1997).** The roles of two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9085-9090.
- Läuger, P. (1991).** *Electrogenic ion pumps*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. und Cox, M. M. (1994).** *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Link, T. A. und von Jagow, G. (1995).** Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial bc₁ complex by blocking a protonatable group. *J. Biol. Chem.* **270**, 25001-25006.
- MacArthur, R., Sucheta, A., Chong, F. F. S. und Einarsdóttir, Ó. (1995).** Photodissociation of a (μ-peroxo)(μ-hydroxo)bis(bis(bipyridyl)-cobalt(III)) complex: A tool to study fast biological reactions involving O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8105-8109.
- MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T. und Michel, H. (1999).** Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry* **38**, 9179-9184.
- Marantz, Y., Nachliel, E., Aagaard, A., Brzezinski, P. und Gutman, M. (1998).** The proton collecting function of the inner surface of cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8590-8595.
- Michel, H. (1998).** The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12819-12824.
- Michel, H. (1999).** Cytochrome c oxidase: Catalytic cycle and mechanisms of proton pumping-A discussion. *Biochemistry* **38**, 15129-15140.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A. und Kannt, A. (1998).** Cytochrome c oxidase: Structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.
- Mitchell, R., Brown, S., Mitchell, P. und Rich, P. R. (1992a).** Rates of cyanide binding to the catalytic intermediates of mammalian cytochrome c oxidase and the effects of cytochrome c and poly-L lysine. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**, 40-48.
- Mitchell, R., Mitchell, P. und Rich, P. R. (1992b).** Protonation states of the catalytic intermediates of cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 188-191.
- Mitchell, R. und Rich, P. R. (1994).** Proton uptake by cytochrome c oxidase on reduction and on ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 19-26.

- Moody, A. J. (1991).** Ligation and electronation states of cytochrome c oxidase in relation to other oxidases and peroxidases. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 617-622.
- Moody, A. J., Brandt, U. und Rich, P. R. (1991).** Single electron reduction of slow and fast cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **293**, 101-105.
- Moody, A. J. und Rich, P. R. (1994).** The reaction of hydrogen peroxide with pulsed cytochrome bo from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **226**, 731-737.
- Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I. und Wikström, M. (1994).** The histidine cycle: A new model for proton translocation in the respiratory heme-copper oxidases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**, 599-608.
- Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I. und Wikström, M. (1996).** Observation and assignment of peroxy and ferryl intermediates in the reduction of dioxygen to water by cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **35**, 12235-12240.
- Müller, M., Thelen, M., O'Shea, P. und Azzi, A. (1986).** Functional reconstitution of proton-pumping cytochrome-c oxidase in phospholipid vesicles. *Methods Enzymol.* **126**, 78-87.
- Nicholls, P. und Chanady, G. A. (1981).** Interactions of cytochrome aa₃ with oxygen and carbon monoxide. The role of the 607 nm complex. *Biochim. Biophys. Acta* **634**, 256-265.
- Nilsson, T. (1992).** Photoinduced electron transfer from tris-2,2'-bipyridylruthenium to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6497-6501.
- Oliveberg, M., Hallén, S. und Nilsson, T. (1991).** Uptake and release of protons during the reaction between cytochrome c oxidase and molecular oxygen. A flow-flash investigation. *Biochemistry* **30**, 436-440.
- Osborne, J. P., Cosper, N. J., Stalhandske, C. M., Scott, R. A., Alben, J. O. und Gennis, R. B. (1999).** Cu XAS shows a change in the ligation of CuB upon reduction of cytochrome bo₃ from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 4526-4532.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. und Michel, H. (1997).** Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody F-v fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10547-10553.
- Paddock, M. L., Graige, M. S., Feher, G. und Okamura, M. Y. (1999).** Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: inhibition of proton transfer by binding of Zn²⁺ or Cd²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6183-6188.
- Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B. und Millett, F. (1993).** Intracomplex electron transfer between ruthenium cytochrome c derivatives and cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **32**, 8492-8498.

- Panda, M. und Robinson, N. C. (1995).** Kinetics and mechanism for the binding of HCN to cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **34**, 10009-10018.
- Paula, S., Sucheta, A., Szundi, I. und Einarsdóttir, O. (1999).** Proton and electron transfer during the reduction of molecular oxygen by fully reduced cytochrome c oxidase: A flow-flash investigation using optical multichannel detection. *Biochemistry* **38**, 3025-3033.
- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B. und Richter, O. M. H. (1998).** Cytochrome c oxidase (heme aa-3) from *Paracoccus denitrificans*: Analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
- Pomès, R., Hummer, G. und Wikström, M. (1998).** Structure and dynamics of a proton shuttle in cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 255-260.
- Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. und Kitagawa, T. (1996).** Resonance Raman/absorption characterization of the oxo intermediates of cytochrome c oxidase generated in its reaction with hydrogen peroxide: pH and H₂O₂ concentration dependence. *Biochemistry* **35**, 8580-8586.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. und Babcock, G. T. (1998).** Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8020-8025.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L. und Babcock, G. T. (2000).** Oxygen activation and reduction in respiration: Involvement of redox-active tyrosine 244. *Science* **290**, 1588-1591.
- Provencher, S. W. und Vogel, R. H. (1983).** Regularisation techniques for inverse problems in molecular biology. In: *Progress in Scientific Computing* (eds. P. Deuflhard and E. Hairer), Birkhäuser, Boston, 304-319.
- Puustinen, A. und Wikström, M. (1999).** Proton exit from the heme-copper oxidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 35-37.
- Ralle, M., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., Wikström, M. und Blackburn, N. J. (1999).** Coordination of Cu-B in reduced and CO-liganded states of cytochrome bo(3) from *Escherichia coli*, is chloride ion a cofactor? *Biochemistry* **38**, 7185-7194.
- Roundhill, D. M. (1994).** Photochemistry and photophysics of metal complexes. In: *Modern Inorganic Chemistry* (ed. J. P. Fackler), Plenum Press, New York, 165-215.

- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H. und Fendler, K. (2000).** Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4632-4636.
- Sacks, V., Marantz, Y., Aagaard, A., Checover, S., Nachliel, E. und Gutman, M. (1998).** The dynamic feature of the proton collecting antenna of a protein surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 232-240.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D. und Konstantinov, A. A. (1999).** Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome c oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state. *Biochemistry* **38**, 4853-4861.
- Skulachev, V. P., Chistyakov, V. V., Jasaitis, A. A. und Smirnova, E. G. (1967).** Inhibition of the respiratory chain by zinc ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 1-6.
- Skurlatov, U. I. und Pourmal, A. P. (1971).** *Bibl. Haematol. (Basel)* **38**, 827-830.
- Smirnova, I. A., Ädelroth, P., Gennis, R. B. und Brzezinski, P. (1999).** Aspartate-132 in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* is involved in a two-step proton transfer during oxo-ferryl formation. *Biochemistry* **38**, 6826-6833.
- Sucheta, A., Georgiadis, K. E. und Einarsdóttir, O. (1997).** Mechanism of cytochrome c oxidase-catalyzed reduction of dioxygen to water: evidence for peroxy and ferryl intermediates at room temperature. *Biochemistry* **36**, 554-565.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1996).** The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1995).** Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**, 1069-1074.
- Valentine, J. S. und Valentine, D. (1971).** Photochemical decomposition of two μ -superoxo-dicobalt ammines in acidic aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 1111-1117.
- Van Eps, N. und Einarsdóttir, Ó. (1998).** Photodissociation of a μ -superoxo-bis(pentaammine cobalt(III)) complex. A tool to study the reduction of dioxygen to water by cytochrome c oxidase. *Biophys. J.* **74**, A78.
- Van Eps, N., Szundi, I. und Einarsdóttir, Ó. (2000).** A new approach for studying fast biological reactions involving dioxygen: The reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with O₂. *Biochemistry* **39**, 14576-14582.

- Verkhovsky, M. I., Belevich, N., Morgan, J. E. und Wikström, M. (1999a).** Proton linkage of cytochrome c oxidoreduction in carbon monoxide-treated cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 184-189.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E. und Wikström, M. (1999b).** Proton translocation by cytochrome c oxidase. *Nature (London)* **400**, 480-483.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M. L. und Wikström, M. (1997).** Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome-c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 6-10.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E. und Wikström, M. (1994).** Oxygen binding and activation: Early steps in the reaction of oxygen with cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **33**, 3079-3086.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E. und Wikström, M. (1995).** Control of electron delivery to the oxygen reduction site of cytochrome c oxidase: A role for protons. *Biochemistry* **34**, 7483-7491.
- Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R. und Konstantinov, A. A. (1998).** Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of Rb. sphaeroides cytochrome c oxidase. *Biochemistry* **37**, 3053-3061.
- Wang, K. F., Zhen, Y. J., Sadoski, R., Grinnell, S., Geren, L., Ferguson-Miller, S., Durham, B. und Millett, F. (1999).** Definition of the interaction domain for cytochrome c on cytochrome c oxidase - II. Rapid kinetic analysis of electron transfer from cytochrome c to Rb. sphaeroides cytochrome oxidase surface mutants. *J. Biol. Chem.* **274**, 38042-38050.
- Weng, L. C. und Baker, G. M. (1991).** Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase. *Biochemistry* **30**, 5727-5733.
- Wikström, M. (1977).** Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature (London)* **266**, 271-273.
- Wikström, M. (1981).** Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4051-4054.
- Wikström, M. (1987).** Insight into the mechanism of cellular respiration from its partial reversal in mitochondria. *Chemica Scripta* **27B**, 53-58.
- Wikström, M. (1988).** Mechanism of cell respiration. *Chemica Scripta* **28A**, 71-74.
- Wikström, M. (1989).** Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature (London)* **338**, 776-778.
- Wikström, M. (2000).** Mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase: a new four-stroke histidine cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 188-198.

- Wikström, M., Jasaitis, A., Backgren, C., Puustinen, A. und Verkhovsky, M. I. (2000).** The role of the D- and K-pathways of proton transfer in the function of the haem-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 514-520.
- Witt, H. und Ludwig, B. (1997).** Isolation, analysis, and deletion of the gene coding for subunit IV of cytochrome c oxidase in *P. denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **272**, 5514-5517.
- Witt, S. N., Blair, D. F. und Chan, S. I. (1986).** Chemical and spectroscopic evidence for the formation of a ferryl iron-a-3 intermediate during turnover of cytochrome c oxidase. *J. Biolog. Chem.* **261**, 8104-8107.
- Witt, S. N. und Chan, S. I. (1987).** Evidence for a ferryl Fea3 in oxygenated cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* **262**, 1446-1448.
- Woodruff, W. H., Einarsdóttir, O., Dyer, R. B., Bagley, K. A., Palmer, G., Atherton, S. J., Goldbeck, R. A., Dawes, T. D. und Kligler, D. S. (1991).** Nature and functional implications of the cytochrome a3 transients after photodissociation of CO-cytochrome oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2588-2592.
- Wrigglesworth, J. M. (1984).** Formation and reduction of a 'peroxy' intermediate of cytochrome c oxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **217**, 715-719.
- Yoshikawa, S., Shinzawa Itoh, K. und Tsukihara, T. (1998a).** Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 7-14.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. und Tsukihara, T. (1998b).** Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* **280**, 1723-1729.
- Zaslavsky, D. und Gennis, R. B. (2000).** Proton pumping by cytochrome oxidase: progress, problems and postulates. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 164-179.
- Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T. und Konstantinov, A. A. (1993).** Flash-induced membrane potential generation by cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* **336**, 389-393.
- Zaslavsky, D., Sadoski, R. C., Wang, K., Durham, B., Gennis, R. B. und Millett, F. (1998).** Single electron reduction of cytochrome c oxidase compound F: resolution of partial steps by transient spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 14910-14916.
- Zaslavsky, D. L., Smirnova, I. A., Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Millett, F. und Konstantinov, A. A. (1995).** Rapid kinetics of membrane potential generation by cytochrome c oxidase with the photoactive Ru(II)-tris-bipyridyl derivative of cytochrome c as electron donor. *FEBS Lett.* **359**, 27-30.

7. Danksagung

Herzlich danken möchte ich hiermit ...

... besonders Herrn Prof. Dr. Bamberg für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die interessante Aufgabenstellung.

... Klaus Fendler für die zahlreichen wertvollen Ratschläge und hilfreichen Diskussionen.

... Aimo Kannt für die wunderbare Einführung in die Welt der Oxidasen, ständige Hilfsbereitschaft und kompetente Beantwortung (fast) aller Fragen.

... Herrn Prof. Dr. Michel für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und zahlreiche Anregungen für Experimente.

... Herrn Prof. Dr. Ludwig für die Bereitstellung von Protein.

... Anja Becker für die Einführung in die Wunderwelt des Bilayers und die netten Schwätzchen am Abzug.

... Thomas Budiman, Christiane Burzik, Christof Grewer, Bettina Himmel, Barbara Legrum, Gudrun Sauer, Natalie Watzke und Dirk Zuber für die schönen Teerunden.

... Ana Bicho für die Verbreitung guter Laune im Labor.

... Andreas Haase für seine stete Hilfe bei Computerproblemen.

... Eva Grabsch und Verena Pintschovius für die zahlreichen hilfreichen Tips.

... Ron Clarke und Christian Lüpfer für die Hilfe in stopped-flow Angelegenheiten.

... Frau Volk für die Gestaltung der vielen schönen Poster.

... den Kollegen in der theoretischen Biophysik für die netten Gespräche in der Mensa.

... Heidi Bergemann, Andrea Dolfi, Thomas Friedrich, Sven Geibel, Thiemo Gropp, Klaus Hartung, Diana Ionescu, Lars Jacobi, David Kane, Jan Koenderink, Eva Lörinczi, Wolfgang Maier, Kerstin Meyer, Henning Müller, Georg Nagel, Doris Ollig, Jürgen Pintschovius, Dagmar Stiegert, Tanjef Szellas, Peter de Vries, Frank Weinreich, Phil Wood und Dirk Zimmermann für das angenehme Arbeitsklima im Haus.

... den hilfreichen Geistern in Werkstatt, Zentrale, Haustechnik, Warenannahme, Bibliothek, Verwaltung sowie der Reinigungsgruppe für die gute Atmosphäre.

... meinen Eltern, Freunden und last but not least meiner Frau Ramona für die behutsamen Hinweise, daß auch noch ein Leben außerhalb des Labors existiert.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maarten Ruitenberg
geboren am: 12. Dezember 1971 in Berlin (West)
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1978 - 1982 Grundschole Bruchköbel-Roßdorf
1982 - 1984 Förderstufe der Gesamtschole Bruchköbel
1984 - 1991 Hohe Landesschole Hanau
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1991 – 1996 9 Semester Chemie-Studium,
Technische Hochschule Darmstadt
Abschluß: Diplom-Ingenieur Chemie
Diplomarbeit in Physikalischer Biochemie, Abt. Prof. Dr. Dencher
Thema: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung des supra-
molekularen Komplexes III aus dem F_O-Fragment der
Chloroplasten-ATP-Synthase

Ersatzdienst

10/96 – 10/97: Zivildienst im Zentrallabor des Stadtkrankenhauses Hanau
Aufgaben: Mitarbeit im Immunologischen Labor; Weiterentwicklung der
vorhandenen HPLC- und PCR-Diagnostik

Promotion

seit 01.11.1997 Doktorarbeit in der Abteilung von Prof. Dr. Bamberg
am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt
Thema: Elektronen- und Protonentransport der Cytochrom-*c*-
Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*